

DIFFERENZIERUNG UND PARTIELLE
REINIGUNG DER DREI
PROTEIN-PHOSPHATASEN:
PHOSPHORYLASE-, TNI- UND
TNT-PHOSPHATASE AUS
KANINCHEN SKELETTMUSKEL

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Diplom-Biologe
Assadollah Djovkar
aus Zaraghan/Iran

Bochum 1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

DIFFERENZIERUNG UND PARTIELLE
REINIGUNG DER DREI
PROTEIN-PHOSPHATASEN:
PHOSPHORYLASE-, TNI- UND
TNT-PHOSPHATASE AUS
KANINCHEN SKELETTMUSKEL

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Diplom-Biologe
Assadollah Djovkar
aus Zaraghan/Iran

Bochum 1979

Referent: Professor Dr. L.M.G. Heilmeyer Jr.

Korreferent: Priv. Doz. Dr. R. Paulsen

Dekan: Professor Dr. H. Langer

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Oktober 1979

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Biologie der
Ruhr-Universität Bochum



Meinen Eltern in Dankbarkeit



Danksagung

Für das Zustandekommen der vorliegenden Arbeit bin ich zu besonderem Dank verpflichtet:

Herrn Professor Dr. L.M.G. Heilmeyer Jr. danke ich für die Überlassung des Themas, ferner für die Anleitung sowie seine hilfreiche Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit.

Herrn Priv. Doz. Dr. R. Paulsen bin ich für die Übernahme des Korreferats zu Dank verpflichtet.

Besonderen Dank schulde ich Frau Dr. M. Varsányi für ihre kritische Diskussion, mit der sie wesentlich zum Fortgang dieser Arbeit beigetragen hat.

Herrn Dr. J. Sperling bin ich für die Gabe von Troponin sehr verbunden.

Herrn U. Siemen möchte ich für die Mithilfe bei den Enzym-Präparationen herzlich danken.

Veröffentlichungen

Ein Teil der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist an folgenden Stellen veröffentlicht worden:

HEILMEYER Jr., L.M.G., VARSÁNYI, M., GRÖSCHEL-STEWART, U., KILIMANN, M.W., DJOVKAR, A., HÖRL, W.H., JENNISSEN, H.P. und DICKNEITE, G. (1978) in: Regulatory Mechanisms of Carbohydrate Metabolism (11th Febs Meeting, Copenhagen 1977, Symposium A.I), (V. ESSMAN, Hrsg.), Vol. 42, S. 119, Pergamon Press, Oxford, New York

DJOVKAR, A., HEILMEYER, Jr. L.M.G. (1978), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie 359, 1075

DJOVKAR, A., HÖRL, W.H., KOHSE, K.P., VARSÁNYI, M. und HEILMEYER, Jr. L.M.G. (1977), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie 358, 1390

Abkürzungen

A	Amper
Ac	Acetat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adosintriphosphat
cAMP	3'5'-Cyclisches Adenosinmonophosphat
Cpm	gezählte radioaktive Impulse pro Minute
Ci	Curie
DTE	1, 4- Dithioerythrit
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EGTA	Äthylenglykol - bis - (β -aminoäthyläther) N, N'-Tetraessigsäure
E	Enzymaktivitätseinheit
GP	β -Glycerophosphat
K _a	Assoziationskonstante
K _m	Michaeliskonstante
ME	2-Mercaptoäthanol
OD	Optische Dichte
P _a	anorganisches Phosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris- (hydroxymethyl-) aminomethan
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	METHODIK	7
2.1.	Präparative Methoden	7
2.1.1.	Präparation von Phosphorylase b aus Kaninchen-Skelettmuskel	7
2.1.2.	Darstellung von ATP- γ - ^{32}P	9
2.1.3.	Darstellung von γ - ^{32}P -markierter Phosphorylase <u>a</u>	10
2.1.4.	Präparation von Phosphorylase-Kinase	12
2.1.5.	Präparation der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Protein-Kinase aus Kaninchen Skelettmuskel	14
2.1.6.	Synthese von Methylamin-substituierter Sepharose 4-B	16
2.1.7.	Herstellung von Histon-Sepharose	17
2.1.8.	Troponin-Präparation	18
2.1.9.	Präparative Phosphorylierung von der Tropomyosinbindenden Untereinheit des Troponins (TNT) mit Ca^{2+} -abhängiger Protein-Kinase	20
2.1.10.	Präparative Phosphorylierung von Actomyosin-Inhibitor-Untereinheit des Troponins (TNI) mit cAMP-abhängiger Protein-Kinase	21
2.2.	Analytische Methoden	21
2.2.1.	Lokalisation des ^{32}P -Phosphateinbaus in phosphorylierten Proteinen	21
2.2.2.	Proteinbestimmung	24
2.2.3.	Messung der Radioaktivität im Flüssigkeitszintillationszähler	24

2.2.4.	Aktivitätsbestimmung der Phosphorylase	25
2.2.5.	Aktivitätsbestimmung der Phosphorylase Kinase	26
2.2.6.	Phosphorylase-Phosphatase-Aktivitätstest	26
2.2.7.	Bestimmung der Troponin-Phosphatase- Aktivität	28
2.2.8.	Bestimmung des Einbaus von ^{32}P -markiertem Phosphat während der Phosphorylierungs- reaktion	29
2.2.9.	Molekulargewichtsbestimmung durch Gel- filtration	30
2.2.10.	Proteinkinase-Aktivitätstest	31
2.2.11.	SDS-Gelelektrophorese	31
2.2.12.	SDS-Disk-Elektrophorese	34
2.2.13.	Disk-Elektrophorese	36
2.2.14.	Lokalisation der Enzymaktivität in den Polyacrylamidgelen	38
2.2.15.	Messung der NaCl Konzentration in den Fraktionen durch die Leitfähigkeit	38
2.2.16.	Programm Hyper	39
2.2.17.	Atomabsorptionsspektrometrische Messungen der Mn^{2+} -Konzentration	41
2.	ERGEBNISSE	42
3.1.	Charakterisierung der phosphorylierten Substrate	42
3.2.	Herstellung des Rohextraktes aus Kaninchen Skelettmuskel	43
3.3.	Bestimmung der Aktivität der Protein- Phosphatasen und Anreicherung über hydro- phobe Chromatographie	44

3.4.	Optimierung der hydrophoben Chromatographie zur Anreicherung von Protein-Phosphatasen	47
3.5.	Erprobung einiger konventioneller Methoden zur Reinigung der Phosphorylase-Phosphatase	50
3.5.1.	Ammoniumsulfat Fällung	50
3.5.2.	Isoelektrische Fällung	52
3.5.3.	Äthanol Fällung	54
3.5.4.	Aceton Fällung	54
3.5.5.	Ionenaustausch Chromatographie an DEAE Cellulose	57
3.5.6.	Gelfiltration über Ultrogel Ac A 34 und Sephadex G-100	57
3.5.7.	Sucrosegradienten Zentrifugation	59
3.6.	Präparation und Reinigung der Protein-Phosphatasen aus Kaninchen Skelettmuskel	59
3.6.1.	Hydrophobe Chromatographie an Methylamin Sepharose	60
3.6.2.	Gelfiltration über Sepharose 6-B	63
3.6.3.	Chromatographie an Histon Sepharose	65
3.6.4.	Gelfiltration über Sepharose 6-B in Anwesenheit von 0.5 M KCl	68
3.7.	Vergleich der Reinigungsschritte der drei Protein-Phosphatasen	71
3.8.	Kinetische Messungen der Dephosphorylierung verschiedener Substrate, Ermittlung der K_m -Werte der Protein-Phosphatasen	74
3.9.	Verdünnungseffekte bei der Dephosphorylierung der Phosphorylase <u>a</u> durch die angereicherte Phosphatase	75

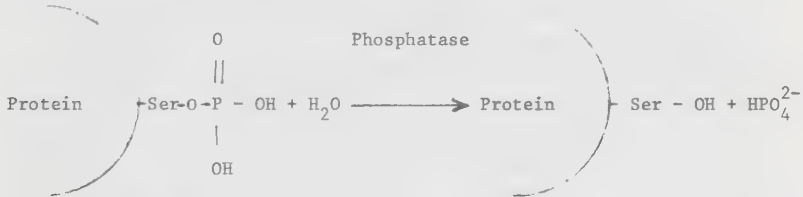
3.9.1.	Einfluß von Metallionen auf die Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase	75
3.9.2.	Untersuchung der Mn^{2+} -bindenden Proteine im Rohextrakt	80
3.9.3.	Mn^{2+} -bindende Proteine in den angereicherten Protein-Phosphatasen (S_{II} -Fraktionen)	80
3.9.4.	Einfluß von 0.1 mM Mn^{2+} auf die Aktivität der weiter angereicherten Protein-Phosphatasen	83
3.10.	Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes der Protein-Phosphatasen durch Gelfiltration	84
3.11.	Elektrophoretische Auftrennung der Protein-Phosphatasen	88
3.11.1.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	88
3.11.2.	Polyacrylamidgel-Elektrophorese in Gegenwart von SDS	92
3.12.	Vergleich der Eigenschaften der Protein-Phosphatasen in Fraktion II	95
3.12.1.	Proteolytische Verdauung der Protein-Phosphatasen durch Trypsin	95
3.12.2.	Einfluß von 8 M Harnstoff auf die Aktivität der Protein-Phosphatasen	97
3.12.3.	Wärmestabilität der Protein-Phosphatase	98
3.12.4.	Einfluß von KCl auf die Aktivität der Protein-Phosphatasen	99
3.12.5.	Einfluß von TNI auf die Phosphorylase-Phosphatase-Aktivität	100
3.12.6.	Einwirkung von Triton X-100 auf die Aktivität der Protein-Phosphatasen	101
3.12.7.	Hemmung der Protein-Phosphatasen durch hitzestabiles Inhibitorprotein	102

4.	DISKUSSION	103
5.	ZUSAMMENFASSUNG	115
6.	LITERATURVERZEICHNIS	117

1. EINLEITUNG

Phosphorylierung von Proteinen durch Kinasen wurde seit langem untersucht. Bei dieser Reaktion wird eine Serin- oder Threonin-Seitenkette einer Proteinuntereinheit mittels ATP phosphoryliert (RUBIN und ROSEN 1975). Über die Dephosphorylierung, katalysiert von Protein-Phosphatasen, die die Reversibilität dieser Phosphorylierungsreaktion ermöglicht, ist weniger bekannt.

Die Protein-Phosphatasen (Phosphoprotein Phosphohydrolase EC 3.1.3.-) hydrolysieren Phosphoester-Bindung von Serin bzw. Threonin-Seitenketten unter Abspaltung von anorganischem Phosphat nach folgender Reaktion:



Das am besten untersuchte Beispiel ist die Phosphorylierung und Dephosphorylierungsreaktion der Glykogen-Phosphorylase (EC 2.4.1.1.) (HELMREICH et al. 1969, FISCHER et al. 1971).

Phosphorylase kann in einer aktiven tetrameren a-Form und einer inaktiven dimeren b-Form vorliegen. Die Phosphorylase b wird durch AMP allosterisch aktiviert, während die a-Form ohne dieses Nucleotid aktiv ist (CORI et al. 1945).

Die Konvertierung der physiologisch inaktiven b- in die a-Form und damit die Aktivierung erfolgt durch Phosphorylierung katalysiert von Phosphorylase Kinase (EC 2.7.1.38) (KREBS 1972, COHEN 1973, JENNISSEN und HEILMEYER 1974), die durch die μ molare Konzentration von Ca^{2+} stimuliert wird (HEILMEYER et al. 1970, BROSTROM et al. 1971). Die Phos-

phorylase-Kinase-Aktivität wurde in verschiedenen Organen wie in Kaninchenskelettmuskel (KREBS et al. 1956), Kaninchenherz (OZAWA 1972) und Rattenleber (RALL et al. 1956, SHIMAZU et al. 1975) nachgewiesen.

Es ist ein komplexes Protein mit einer Molmasse von 1.28×10^6 und besitzt die Untereinheitenstruktur $(\alpha \beta \gamma \delta)_4$ (COHEN et al. 1978). Eine regulatorische Funktion wurde α zugeordnet, während die δ Untereinheit wahrscheinlich an der Vermittlung der Ca^{2+} -Sensibilität beteiligt ist. Die Zuordnung der katalytischen Funktion zu β oder γ ist umstritten (FISCHER et al. 1976 in Symp. Skuster et al. 1977). Das Enzym aus der langsamen roten Skelettmuskulatur des Kaninchens (JENNISSEN und HEILMEYER 1974) enthält anstelle von α die etwas leichtere Untereinheit α' . Phosphorylase b ist das Proteinsubstrat für Phosphorylase Kinase, mit dem sie die höchste spezifische Aktivität ausdrückt und dessen physiologische Rolle am besten verstanden wird. Daneben phosphoryliert dieses Enzym auch Tropomyosin (siehe unten) und sich selbst in Gegenwart von Ca^{2+} autokatalytisch und zwar an der α - und β -Untereinheit (WALSH et al. 1971, WANG et al. 1976, COHEN et al. 1974). Eine Phosphorylierung der Phosphorylase Kinase kann auch durch eine cAMP-abhängige Protein Kinase (EC 2.7.1.37) in Abwesenheit von Ca^{2+} katalysiert werden (DE LANGE et al. 1968). Hierbei wird zunächst die β -Untereinheit und danach die α -Untereinheit phosphoryliert. Parallel zur Phosphorylierung der β -Untereinheit steigt die Enzymaktivität an (COHEN et al. 1974, HAYAKAWA et al. 1973).

Die cAMP-abhängige Protein Kinase ist in der Lage, andere Proteine zu phosphorylieren.

Hinweise auf die Beteiligung sowohl der Ca^{2+} -abhängigen Phosphorylase-Kinase sowie der cAMP-abhängigen Protein-Kinase an der Regulation der Muskelkontraktion durch

Phosphorylierung von Strukturproteinen sind durch Arbeiten von PRATJE und HEILMEYER (1973), (PERRY und COLE 1973, 1974), ENGLAND et al. (1972) und SPERLING et al. (1978) geliefert worden. So zeigen auffallenderweise die beiden oben genannten Schlüsselenzyme der Glykogenolyse, die maßgeblich an der Bereitstellung von Energie in Form von ATP beteiligt sind, Aktivitäten am Regulatorprotein der Muskelkontraktion, dem Troponin.

Troponin ist ein Komplex aus drei verschiedenen Untereinheiten: einer Tropomyosin-bindenden Untereinheit (TNT), einer Inhibitorkomponente (TNI) und einem Ca^{2+} -Bindungsprotein (TNC) (EBASHI et al. und GREASER et al. 1972).

Erstmals berichteten BAILEY und VILLAR-PALASI (1971) von einer Phosphorylierung der isolierten Troponinuntereinheit TNI und der TNI-Untereinheit eines TNI-TNT-Komplexes mit einer cAMP-abhängigen Protein Kinase. PRATJE und HEILMEYER (1972) berichteten über die Phosphorylierung des TNT's in einem "Relaxing Protein System" mit Ca^{2+} -abhängiger Protein-Kinase.

Ebenfalls wurde eine Phosphorylierung der TNT- und TNI-Untereinheiten des Troponins durch Ca^{2+} -abhängige Phosphorylase-Kinase sowie durch cAMP-abhängige Protein Kinase von STULL et al. (1972) und PERRY und COLE (1973, 1974) beschrieben. Darüber hinaus wurde eine Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Abhängigkeit der Phosphorylierung des nativen Troponinkomplexes mit cAMP-abhängiger Protein Kinase von SPERLING et al. (1978) gezeigt. Die Beobachtungen von DICKNEITE und HEILMEYER (1978) zeigen, daß die Phosphorylierung von TNT und Phosphorylase b durch Phosphorylase-Kinase zwar von einem Enzym, aber wahrscheinlich von zwei verschiedenen katalytischen Zentren katalysiert wird. Phosphorylase Kinase phosphoryliert TNT im nativen Troponin-Komplex 300-fach langsamer als Phosphorylase b.

Protein-Phosphatasen können die Dephosphorylierung verschiedener Phosphoproteine katalysieren. Im Skelettmuskel z.B. ist Phosphorylase-Phosphatase (EC 3.1.3.17.) enthalten, deren eigentliche Funktion in der Konvertierung der Phosphorylase a in die b-Form besteht (siehe oben) (CORI et al. 1945, KELLER et al. 1954).

Phosphorylase-Phosphatase soll auch die Dephosphorylierung phosphorylierter und isolierter TNI-Untereinheiten des Troponins katalysieren (ENGLAND et al. 1972). Deshalb wurde geschlossen, daß die TNI-Phosphatase mit Phosphorylase-Phosphatase identisch ist. Die phosphorylierte Tropomyosin-bindende Untereinheit des Troponins (TNT) soll ebenfalls durch dieselbe Phosphorylase-Phosphatase desphosphoryliert werden (ENGLAND et al. 1973 und STULL et al. 1972). Eine wenig ausgeprägte Spezifität der Phosphorylase-Phosphatase wurde auch von KATO und BISHOP (1972), ZIEVE und GLINSMANN (1973), KATO und SATO (1974) und NAKAI und THOMAS (1974) beschrieben.

Im Gegensatz dazu teilen ANTONIW et al. (1977) die Protein-Phosphatasen aufgrund ihrer Substratspezifität in Histon-Phosphatase, α -Phosphorylase Kinase-Phosphatase und die Protein-Phosphatase III, die sowohl Phosphorylase-, wie Glykogen-Synthetase b_1 - und als auch β -Phosphorylase-Kinase dephosphoryliert, ein. Lediglich die letztgenannte Phosphatase III katalysiert die Dephosphorylierung von Proteinen, die verschiedene Funktionen im Glykogenstoffwechsel haben, und wird deshalb "general phosphatase" genannt. Ihre physiologische Rolle im Glykogenstoffwechsel ist unklar. Eine weitere Unterscheidung der Phosphatasen ist aufgrund des unterschiedlichen Verhaltens bei der Hemmung durch Inhibitor-Proteine möglich. Ein hitzestabiler, trypsinlabiler Inhibitor wurde aus Kaninchenske-

lettmuskel isoliert, bei dessen Anwesenheit die Phosphorylase-Phosphatase gehemmt wird (BRAND et al. 1974).

Zwei weitere Inhibitoren wurden von HUANG und GLINSMAN (1976) sowie COHEN et al. (1977) beschrieben. Diese beiden Inhibitoren verhalten sich verschieden im Hinblick auf die Hemmung bei Benutzung verschiedener phosphorylierter Proteine (NIMMO und COHEN 1978, ANTONIW et al. 1977).

KATO und SATO (1974), DJOVKAR (1974) und HSIAO et al. (1978) berichteten von zwei Phosphorylase-Phosphatasen, die sich in ihrer Aktivierbarkeit durch zweiwertige Metall-Ionen wie Co^{2+} und Mn^{2+} unterscheiden. Über die Wirkung dieser Metall-Ionen auf die TNI bzw. TNT Dephosphorylierung ist bisher nichts bekannt. Möglicherweise beruhen diese teils widersprüchlichen Aussagen über die Identität bzw. Nichtidentität der verschiedenen Protein-Phosphatasen auf den drastischen Reinigungsschritten, die zur partiellen Anreicherung verwendet werden.

So wird Phosphorylase-Phosphatase in einem Schritt mit 6 M Harnstoff behandelt (GRATECOS et al. 1973, 1974). Genauso könnte eine Harnstoffbehandlung (GREASER und GERGELY 1971, EBASHI 1972) des Substrates, wie es z.B. zur Trennung der Troponinuntereinheiten benutzt wird, zur Unspezifität führen, die die oben genannten Diskrepanzen verursachen könnte. Es sollte deshalb geprüft werden, ob Troponin, das im nativen Komplex in der TNT- oder TNI-Untereinheit phosphoryliert war, nur von einer Phosphatase, die identisch mit Phosphorylase-Phosphatase ist, dephosphoryliert wird oder ob es verschiedene Phosphatasen für die beiden phosphorylierten Troponinuntereinheiten sowie Phosphorylase-Phosphatase gibt. Dabei sollten auch Reinigungsschritte für die Phosphatasen vermie-

den werden, die zu partieller Denaturierung führen könnten.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß Phosphorylase-Phosphatase und TNT- bzw. TNI-Phosphatase verschiedene Phosphatasen sind, wie sich z.B. anhand der Mn^{2+} -Aktivierbarkeit, Trypsinsensitivität, relativen Anreicherung und der elektrophoretischen Mobilität zeigen läßt.

2. METHODIK

2.1. Präparative Methoden

2.1.1. Präparation von Phosphorylase b aus Kaninchen Skelettmuskel nach FISCHER und KREBS (1958)

3 kg Kaninchen-Skelettmuskulatur werden durch den Fleischwolf gedreht und bei Zimmertemperatur 15 Minuten unter Umrühren mit der gleichen Gewichtsmenge H_2O dest. extrahiert und durch eine vierfache Lage Verbandsmull ausgepreßt. Der Extrakt wird auf $4^{\circ} C$ abgekühlt.

Der Extraktionsvorgang wird zum zweiten Mal mit 3 l H_2O dest. 10 Minuten, anschließend zum dritten Mal mit 1.5 l H_2O dest. 5 Minuten lang wiederholt.

Die vereinigten Extrakte werden 4 Stunden bei $4^{\circ} C$ gegen die 30-fache Menge H_2O dest. dialysiert.

Alle weiteren Schritte werden, sofern nicht anders angegeben, bei $4^{\circ} C$ durchgeführt. Der pH-Wert des Rohextraktes wird mit 1 N Essigsäure auf pH 5.2 - 5.3 eingestellt und der entstehende Niederschlag wird unmittelbar bei $15000 \times g$ 20 Minuten lang abzentrifugiert. Nach Filtration über Glaswolle bringt man den Überstand durch Zusatz von festem Kaliumhydrogencarbonat auf pH 6.8.

Dem Überstand wird 250 g Ammoniumsulfat pro Liter Lösung (41 % Sättigung) zugesetzt, wobei der pH-Wert durch Zusatz von konzentrierter Ammoniaklösung auf pH 6.8 gehalten wird.

Das Präzipitat läßt man über Nacht im Kühlraum sedimentieren. Der größte Teil des Überstandes wird abdekantiert und der Niederschlag bei $15000 \times g$ bei 0°C 25 Minuten abzentrifugiert. Der Niederschlag wird in 150 ml H_2O dest. bei 22°C aufgenommen, vorsichtig im Potter-Homogenisator homogenisiert und für 2 - 4 Stunden gegen 5 l kaltes H_2O dest., über Nacht gegen 5 Liter 1 mM Tris/HCl (pH 7.0) dialysiert. Zum Dialysat wird 1/500 des Volumens 15 M ME (verdünnt mit 5 ml H_2O dest.), 1/400 des Volumens 0.2 M EDTA (pH 7.0) zugegeben, und der pH-Wert wird mit 2 M Tris auf 8.8 gebracht.

Die Lösung wird für 60 Minuten bei 37°C inkubiert, danach auf 5°C abgekühlt, mit 1 M Essigsäure neutralisiert. Der aufgetretene Niederschlag wird 15 Minuten bei $30000 \times g$ (0°C) abzentrifugiert.

Zum Überstand gibt man 1/100 Volumen 1.0 M $\text{Mg}(\text{Ac})_2$ und 1/100 Volumen 0.1 M AMP (pH 7.0) zu.

Das Enzym kristallisiert über Nacht im Kühlraum aus.

Am folgenden Tag wird die Phosphorylase noch zweimal umkristallisiert. Dazu zentrifugiert man die Kristalle 15 Minuten lang bei $30000 \times g$ ab, löst sie bei Zimmertemperatur in 100 ml 20 mM ME 10 mM Tris/HCl (pH 7.0) auf und zentrifugiert einen eventuell aufgetretenen Niederschlag denaturierter Proteine bei 22°C und $30000 \times g$ ab.

Das Enzym wird erneut nach Zugabe von 1/100 Volumen 1 M $\text{Mg}(\text{Ac})_2$ und 1/100 Volumen 0.1 M AMP wieder auskristallisiert.

2.1.2. Darstellung von ATP- γ - ^{32}P nach GLYNN und
CHAPPEL (1964)

18.3 mg ATP-Dinatriumsalz (ca. 30 μ Mol) werden in ein Reagenzglas eingewogen. Es werden hinzupipettiert:

0.5 ml 0.5 M Tris/HCl (pH 8.0), 2.5 ml H_2O dest., 0.03 ml 1 M Magnesiumchlorid, 0.5 ml 0.1 M NaOH, 0.1 ml Cysteinbase (12 mg/ml), 0.17 ml 3-Phosphoglycerat (16.2 mg/ml), 0.005 ml NAD (10 mg/ml), 3.0 ml ^{32}P -Phosphat (10 mCi ^{32}P -Orthophosphat in 1 ml 0.01 N HCl + 0.2 ml 10 mM K_2HPO_4 /10 mM KH_2PO_4 + 1.8 ml H_2O), 0.05 ml Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (10 mg/ml) und 0.005 ml 3-Phosphoglycerat-Kinase (10.0 mg/ml).

Diese Mischung wird 60 Minuten bei 30° C inkubiert, dann werden 150 g Aktivkohle (behandelt mit 0.1 N HCl und 0.1 N Ammoniaklösung) zugegeben.

Die Suspension wird über eine mit Cellulose beschichtete Fritte filtriert und mit 10 ml H_2O dest. nachgewaschen. Das an der Aktivkohle absorbierte Nucleotid wird dann mit 25 ml 50 % Äthanol-/1 % Ammoniaklösung eluiert, am Rotationsverdampfer (bis zur Trockenmasse) eingengt, in 2 ml H_2O dest. aufgenommen und bei -30° C aufbewahrt.

2.1.3. Darstellung von γ -³²P-markierter Phosphorylase a nach KREBS et al. (1958)

Die Phosphorylase b-Kristallsuspension wird 15 Minuten bei 30000 x g zentrifugiert, das sedimentierte Enzym wird in 30 ml 50 mM Tris/10 mM GP-Puffer (pH 7.0) gelöst und durch Filtration über eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte Cellulose-Aktivkohle Säule (1.0 x 2.0 cm) von AMP befreit. Als Maß für den Nucleotidgehalt dient der Quotient der Extinktionen bei 260 und 280 nm; beträgt er weniger als 0.53, so ist die Phosphorylase nucleotidfrei (COHEN et al. 1971). Die AMP freie Phosphorylase b wird in einer Konzentration von 25 mg/ml nach Zugabe von 10 mM Mg (Ac)₂ in 50 mM Tris/HCl, 10 mM GP (pH 7.0) gelöst. Pro mg Phosphorylase b wird 1 - 2 μ Ci ATP- γ -³²P (1 mM ATP) siehe 2.1.2. zugesetzt und der pH-Wert der Lösung wird mit 2 M Tris auf 8.2 eingestellt.

Durch Zugabe von Phosphorylase Kinase (3 μ g/mg Phosphorylase) mit einer spezifischen Aktivität von ca. 8000 E/mg wird die Reaktion gestartet. Zur Bestimmung der Konvertierungsrate wird in gleichen Abständen ein Aliquot entnommen und auf Eis gestellt.

Bei einer Verdünnung von 1 : 1000 wird die Aktivität der Phosphorylase mit Hilfe eines Autoanalyzers nach HASCHKE und HEILMEYER (1972) bestimmt.

Der Ansatz wird 60 Minuten bei 30° C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt.

Man läßt die Phosphorylase a über Nacht im Kühlraum auskristallisieren, zentrifugiert die Kristalle bei 30000 x g 15 Minuten lang ab und löst sie in 10 mM Tris/

20 mM ME, pH 7.0 (für 100 mg Phosphorylase ca. 5 ml) bei 35° C wieder auf. Zur Entfernung des ATP wird die Lösung, wie oben beschrieben, über Cellulose-Aktivkohle filtriert und auf Eis gestellt. Innerhalb von 3 - 4 Stunden kristallisiert das Enzym aus. Die Phosphorylase a wird noch zweimal umkristallisiert.

Dann zentrifugiert man die Kristallsuspension 15 Minuten bei 30000 x g, löst den Niederschlag bei 37° C in 20 ml 10 mM Tris/20 mM ME Puffer (pH 7.0) auf und zentrifugiert einen eventuell aufgetretenen Niederschlag denaturierter Proteine bei 22° C mit 30000 x g ab. Das Enzym läßt man auf Eis wieder auskristallisieren.

Die Phosphorylase besitzt eine Protein Konzentration von 25 mg/ml und eine spezifische Aktivität von 80 E/mg.

Zur Berechnung der Konvertierungsausbeute gehen wir von einem Verhältnis der spezifischen Aktivität a/b von 0.62 aus. Es wird eine Umwandlungsausbeute von 85 % erreicht. Dabei wird ein Einbau von ein Mol Phosphat/ 100000 g Phosphorylase gemessen.

2.1.4. Präparation von Phosphorylase-Kinase nach
COHEN (1973), modifiziert nach JENNISSEN und
HEILMEYER (1975)

Das Fleisch von 10 Kaninchen (ca. 5 kg) wird im Fleischwolf zerkleinert, in 1 kg-Portionen abgewogen und mit je 2.5 l 4 mM EDTA (pH 7.0) im Waring-Blendor 50 Sekunden bei höchster Geschwindigkeitsstufe homogenisiert.

Der Muskelbrei wird 25 Minuten bei 13000 x g zentrifugiert. Den Überstand filtriert man über Glaswolle und unterzieht ihn anschließend mit 1 N Essigsäure einer Säurefällung (pH 5.9 - 6.1). Der Endpunkt der Fällung wird daran erkannt, daß die Zahlen einer mit Suspension gefüllten 10 ml-Meßpipette nicht mehr von der Rückseite her lesbar sind. Der Niederschlag wird mit 5 ml 100 mM GP; 4 mM EDTA (pH 8.0), nach erneuter Zentrifugation für 20 Minuten bei 15000 x g neutralisiert.

Danach wird die Suspension im Potter in maximal 300 ml 50 mM GP, 2 mM EDTA, 15 mM ME, 0.02 % NaN_3 (pH 7.0), homogenisiert und für 100 Minuten bei 12000 x g zentrifugiert. Zum Überstand werden 52 % des Volumens 3.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung zugegeben. Nach 10 Minuten wird die Suspension bei 15000 x g 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Niederschlag wird in 30 ml 50 mM GP/HCl (pH 7.0), 2 mM EDTA, 15 mM ME, 0.02 % NaN_3 , aufgenommen und 60 Minuten gegen 1.5 l des gleichen Puffers dialysiert.

Die Suspension wird für 20 Minuten bei 30000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird auf eine mit demselben Puffer äquilibrierte (35 x 10 cm) Sepharose 4-B-Säule gegeben

und mit dem gleichen Puffer eluiert. Es wurden drei bei 280 nm absorbierende Proteingipfel beobachtet. Die Fraktionen des mittleren Gipfels werden gesammelt und auf eine DEAE-Cellulose-Säule (60 x 4 cm) gegeben, die ebenfalls mit dem oben genannten GP-Puffer äquilibriert wurde.

Durch die Elution mit einem linearen NaCl-Gradienten (1200 ml, 0 - 0.5 M) erhält man wieder drei bei einer Wellenlänge von 280 nm absorbierende Proteingipfel.

Jede dritte der im UV-Bereich absorbierenden Fraktionen wird gelelektrophoretisch, wie von COHEN beschrieben, untersucht.

Die Fraktionen des mittleren Gipfels enthalten Phosphorylase-Kinase mit der typischen Struktur der Untereinheiten. Diese Fraktionen werden vereinigt und durch eine Ultrafiltration in einer Amiconzelle über einem XM 100 Filter auf 2 - 3 mg/ml eingeeengt. Die so erhaltene Phosphorylase Kinase wird eingefroren und bei -30°C aufbewahrt.

2.1.5. Präparation der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Protein-Kinase aus Kaninchen-Skelettmuskel nach BEAVO, BECHTEL und KREBS (1974)

10 kg Kaninchenmuskel werden im Fleischwolf zerkleinert. Das Fleisch wird in 1 kg-Portionen abgewogen und mit je 2.5 l 4 mM EDTA pH 7.0, 15 mM ME im Waring-Blendor bei höchster Geschwindigkeitsstufe 60 Sekunden homogenisiert. Der Fleischbrei wird 20 Minuten bei 11,000 x g abzentrifugiert und der Überstand durch Glaswolle filtriert. Der so erhaltene Rohextrakt wird mit 1 N Essigsäure auf einen pH von 6.1 eingestellt. Der dadurch erhaltene Niederschlag wird bei 11,000 x g 20 Minuten abzentrifugiert. Zu den sich ergebenden 24 l Überstand wird 12 l CM-Sephadex-G 50 Gel in 30 mM Kaliumphosphat pH 6.1, 15 mM ME, 0.1 mM EDTA gegeben.

Es wird 15 Minuten gut gerührt. Dann wird das Gel über einen Büchner-Trichter abgesaugt. Die Behandlung mit CM-Sephadex-G 50 bei (pH 6.1) erfolgt zweimal in kurzen Abständen hintereinander. Der erhaltene Überstand (38.5 l) wird mit 1 N KOH auf einen pH Wert von 6.7 eingestellt und mit 24 l CM-Sephadex-G 50 in 30 mM Kaliumphosphat, 15 mM ME, 0.1 mM EDTA pH 6.7 versetzt. Für 15 Minuten wird gut gerührt und dann über einen Büchner-Trichter abgesaugt. Dieser Vorgang wird einmal wiederholt. Das so erhaltene Filtrat (59 l) wird mit 205 mg cAMP auf eine Konzentration von 10 μ M cAMP gebracht und mit 354 ml CM-Sephadex-G 50 in 30 mM Kaliumphosphat pH 6.7, 15 mM ME, 0.1 mM EDTA versetzt und 15 Minuten gut gerührt.

Das Gel wird abgesaugt, und der Überstand wird verworfen. Mit 5 l 30 mM Kaliumphosphat pH 6.7, 15 mM ME, 0.1 mM

EDTA wird das Gel auf einem Büchner-Trichter gewaschen, im gleichen Puffer suspendiert und in eine Säule (5 x 20 cm) gefüllt. Mit 4 l eines linearen Salzgradienten von 30 - 300 mM Kaliumphosphat pH 6.7, 0.1 mM EDTA, 15 mM ME wird das Protein mit einer Durchflußrate von 200 ml/Std. in Fraktionen zu je 20 ml eluiert.

Die Fraktionen werden auf Proteingehalt und Enzym-Aktivität getestet. Die Fraktionen, die Protein-Kinase-Aktivität enthalten, werden vereinigt und durch Ultrafiltration über ein PM-10-Filter in einer Amicon-Zelle auf 13 ml eingeengt. Dieses Material wird auf eine (2.4 x 90 cm)-Säule, die mit Sephadex-G 100 gefüllt und mit 30 mM Kaliumphosphat (pH 6.7), 15 mM ME, 0.1 mM EDTA äquilibriert wurde, gegeben.

Es wird mit dem gleichen Puffer eluiert und das Eluat wird in Fraktionen zu 8 ml gesammelt.

Nach Bestimmung der Aktivität werden die Fraktionen, die Enzym-Aktivität enthalten, vereinigt und gegen 50 % Glycerin dialysiert. Das Material wird bei -30° C aufbewahrt. Mit dieser Methode erreicht man eine 8500-fache Anreicherung des Enzyms bei einer Enzymausbeute von 10 %.

2.1.6. Synthese von Methylamin-substituierter Sepharose 4-B nach CUATRECASAS (1970), JENNISSEN und HEILMEYER (1975)

100 ml Sepharose 4-B wird mit ca. 1 l H_2O gewaschen und anschließend trockengesaugt. Zu den 50 g der trockenen Sepharose fügt man 22 ml H_2O , 25.2 ml Dioxan (wasserfrei) 48 ml 2.5 M Phosphat-Puffer (1.8 M K_3PO_4 , 0.8 M K_2HPO_4 pH 12.0) und startet mit 14.8 ml 20 % BrCN-Lösung (Endkonzentration 18.5 mg/ml BrCN Ansatz). BrCN wird in wasserfreiem Dioxan gelöst, eventuell auftretender Niederschlag wird abfiltriert und der BrCN-Gehalt jodometrisch bestimmt.

Der pH-Wert von 12 und die Temperatur von 5 - 10° C sollen während der Aktivierung der Sepharose konstant gehalten werden. Nach einer Aktivierung von 12 Minuten wird das Gemisch über einen Büchner-Trichter abfiltriert und mit 1500 ml 0.1 M Na_2CO_3 (pH 8.3) gewaschen. Zum Koppeln des Amins wird die Sepharose mit 100 ml 2M Methylamin (pH 10, ^{14}C -markiert; 0.25 μ Ci/ml) versetzt. Der gesamte Vorgang des Waschens und Einbringens der Sepharose in die Methylamin-Lösung soll nicht länger als 90 Sekunden dauern.

Die Sepharose wird unter Rühren 3 Stunden inkubiert und danach mit je 1 l kaltem H_2O , 0.01 N HCl, H_2O , 0.01 N NaOH und H_2O gewaschen. Um die Menge des an der Sepharose gebundenen Methylamins zu bestimmen, geht man folgendermaßen vor:

Man füllt ca. 1 ml Methylamin-Sepharose in eine gradierte 5 ml-Säule und läßt diese trockenlaufen. Das gepackte Gel-Volumen wird abgelesen, das Gel wird quan-

titativ in ein Reagenzglas überführt und mit 1 ml 32 % HCl 45 Minuten bei 50° C hydrolysiert. Das Hydrolysat wird mit 0.1 ml 20 N NaOH versetzt und 1.5 ml davon werden in 18 ml Szintillationslösung B (siehe unten. 2.2.3.) zur Ermittlung der an Sepharose gebundenen Radioaktivität im Szintillationszähler gezählt.

Die Menge des an Sepharose gebundenen Amins wird als μ Mol Methylamin pro ml gepackte Sepharose angegeben.

2.1.7. Herstellung von Histon-Sepharose nach KHANDEWAL et al. (1976)

Die Darstellung der Histon-Sepharose erfolgt analog zu der von Methylamin-Sepharose mit einer BrCN Konz. von 31 mg/ml im Aktivierungsansatz.

Das Gel (100 ml trockengesaugte Sepharose) wird hier nach Stoppen der Aktivierung durch 1.5 l 0.1 M NaHCO₃ (pH 12) in 200 ml Histon-Lösung (5.0 mg/ml in 0.1 M NaHCO₃ 0° C) gegeben und anschließend für 24 Stunden bei 4° C darin gerührt. Die Histon-Sepharose wird mit 1.5 l 0.1 M NaHCO₃ (pH 9.2) und ca. 2 l H₂O dest. gewaschen und in 0.02 M, N₃ aufbewahrt.

2.1.8. Troponin-Präparation nach SPERLING (1978)

Die Troponin-Präparation erfolgt, bis auf die Entfernung der Proteasen, nach der von EBASHI et al. (1971) angegebenen Methode. Alle Präparationsschritte werden in der Kühlzelle bei 4° C oder im Eisbad durchgeführt.

1 kg Kaninchen-Skelettmuskel wird im Fleischwolf zerkleinert und mit 3 l Guba-Straub-Lösung (0.3 M KCl, 0.1 M KH_2PO_4 , 0.05 M K_2HPO_4) 30 Minuten lang gerührt. Der Muskelbrei wird 20 Minuten bei 15000 x g abzentrifugiert. Der Niederschlag wird erneut mit 2 l Guba-Straub-Lösung versetzt, 2 Minuten gerührt und durch eine 2-fache Lage Gaze ausgepreßt.

Der Rückstand wird mit 3 l 2 mM KCl, 2 mM KHCO_3 versetzt, 10 Minuten gerührt und durch eine 2-fache Lage Gaze ausgepreßt. Danach wird der Rückstand zweimal mit je 2 l H_2O bidest. 5 Minuten gerührt und durch Gaze filtriert. Der so gewaschene Rückstand wird mit einem halben Volumen einer 1.2 M LiCl-Lösung versetzt, 5 Minuten gerührt und bei 15000 x g abzentrifugiert.

Daraufhin wird der Rückstand mit dem gleichen Volumen einer 0.4 M LiCl-Lösung 120 Minuten extrahiert; dabei wird gleichzeitig der pH des Breies mit 1 N HCl während der Extraktionszeit langsam auf 4.5 eingestellt.

Es wird 20 Minuten bei 15000 x g zentrifugiert, der Überstand durch Glaswolle filtriert und mit kristallinem NaHCO_3 wird der pH-Wert der Lösung auf pH 7.2 eingestellt. Das so gewonnene Rohtroponin wird zum Entfernen von Proteasen entweder mit 100 g trockengesaugter Casein-Sephrose (6 mg Protein/g trockene Casein-Sephrose), 1 ml ME

und 2 ml einer 0.2 Mg $(\text{H}_3\text{COO})_2$ -Lösung versetzt, 5 Minuten gerührt und über einen Büchner-Trichter abgesaugt, oder unter den gleichen Bedingungen mit 10 g hitzedenaturiertem Casein (das Casein wird durch die nachfolgende Ammoniumsulfatfällung wieder entfernt) versetzt.

Das auf diese Weise von Proteasen gereinigte Rohprotein wird zur weiteren Bearbeitung einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterzogen.

Dazu wird die Lösung auf 46 % Ammoniumsulfatsättigung (28 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pro 100 ml) gebracht und bei 15000 x g 20 Minuten lang abzentrifugiert. Der Überstand wird mit weiteren 6 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pro 100 ml auf 54 % Ammoniumsulfatsättigung gebracht und 20 Minuten bei 15000 x g abzentrifugiert. Der Niederschlag wird mit allergrößter Sorgfalt in 50 ml 1 mM NaHCO_3 Lösung aufgenommen und 12 Stunden gegen die gleiche Lösung dialysiert. Noch vorhandene Verunreinigungen anderer Strukturproteine werden bei 120000 x g 30 Minuten lang abzentrifugiert. Die Troponin-Lösung wird bei -30°C eingeforen und aufbewahrt.

Die Ausbeute beträgt etwa 800 mg Protein pro kg Fleisch.

2.1.9. Präparative Phosphorylierung von der Tropomyosin-
bindenden Untereinheit des Troponins (TNT) mit
Ca²⁺-abhängiger Protein-Kinase

In einem Inkubationsansatz von 3.5 ml werden 5.2 mg/ml Troponin nach SPERLING (1978) mit 50 mM Tris/HCl pH 7.5/ 15 mM ME, 4 mM Mg (Ac)₂, 60 µg/ml Phosphorylase-Kinase gereinigt nach JENNISSEN und HEILMEYER (1975), 2 mM ATP-γ-³²P, 10 - 20 Ci/Mol zusammengemischt und für 3 Stunden bei 30° C inkubiert.

Nach erfolgter Reaktion werden die phosphorylierten Proteine, sowie das überschüssige ATP durch Gelfiltration über eine (2.5 x 30 cm) Sepharose 6-B-Säule äquilibriert in 50 mM Tris 20 mM ME (pH 7.5) bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 30 ml/h getrennt und in 4.5 ml Fraktionen gesammelt. Von jeder Fraktion wird ein Aliquot entnommen und das an ³²P-gebundene Protein, wie unter 2.2.8. beschrieben, bestimmt. Die phosphorylierten Fraktionen werden vereinigt und durch Ultrafiltration über eine PM-10 Filter in einer Amicon-Zelle auf 1/10 des Ausgangsvolumens eingeengt und bei -20° C aufbewahrt.

2.1.10. Präparative Phosphorylierung von Actomyosin-Inhibitor-Untereinheit des Troponins (TNI) mit cAMP-abhängiger Protein-Kinase

Bei einem Inkubationsansatz von 3.5 ml werden 50 mM GP, 15 mM ME, 0.1 mM EGTA (pH 6.9), 0.5 mM ATP- γ - ^{32}P (10 - 20 Ci/Mol), 3 $\mu\text{g/ml}$ katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Protein-Kinase (siehe 2.1.5.) und 5.2 mg/ml Troponin zusammengemischt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 4 mM $\text{Mg}(\text{Ac})_2$ gestartet und für 3 Stunden bei 30° C inkubiert. Die phosphorylierten Proteine werden wie unter 2.1.9. beschrieben, weiterbehandelt. Die Analyse der beiden phosphorylierten Troponine ist unter 2.2.1. beschrieben.

2.2. Analytische Methoden

2.2.1. Lokalisation des ^{32}P -Phosphateinbaus in phosphorylierten Proteinen

Die nach 2.1.9. oder 2.1.10 phosphorylierten Proteine werden durch SDS-Gelelektrophorese (siehe 2.2.11.) in ihre Untereinheiten aufgetrennt. Die Elektrophorese-Gele werden im Gilson GF-Gelfraktionator in 1 mm dicke Scheibchen geschnitten und zerkleinert. Jedes Scheibchen wird mit 5 ml Szintillatorlösung A (siehe unter 2.2.3.) versetzt und im Szintillationszähler analysiert. Durch Vergleich

der Häufigkeitsverteilung der Radioaktivitätsmaxima mit den durch Coomassie Brilliant blau R-250 angefärbten Proteinbanden kann der Phosphateinbau den entsprechenden Untereinheiten des Proteins zugeordnet (siehe Abb. I, II) werden. Eine quantitative Bestimmung des Phosphateinbaus kann bei dieser Methode direkt durch Addition der Radioaktivität pro Bande erfolgen, da es sich dabei um eine integrale Messung handelt.

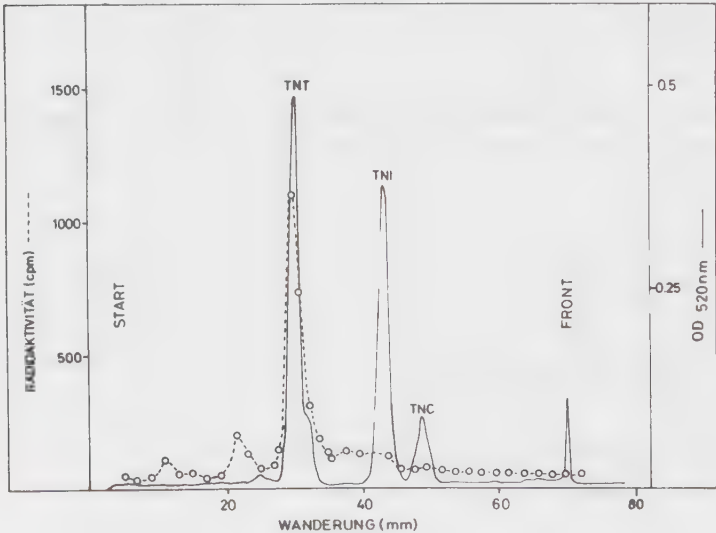


Abb. I: Lokalisation des mit Ca^{2+} -abhängiger Protein-Kinase eingebauten Phosphates in Troponin.

Die Untereinheit des Troponins T wurden wie unter 2.1.9. beschrieben, phosphoryliert. 50 μg phosphoryliertes Troponin wurde durch SDS-Gelelektrophorese nach WEBER und OSBORN (1969) aufgetrennt und analysiert.

Weitere Angaben und Bedingungen wurden im Text beschrieben.

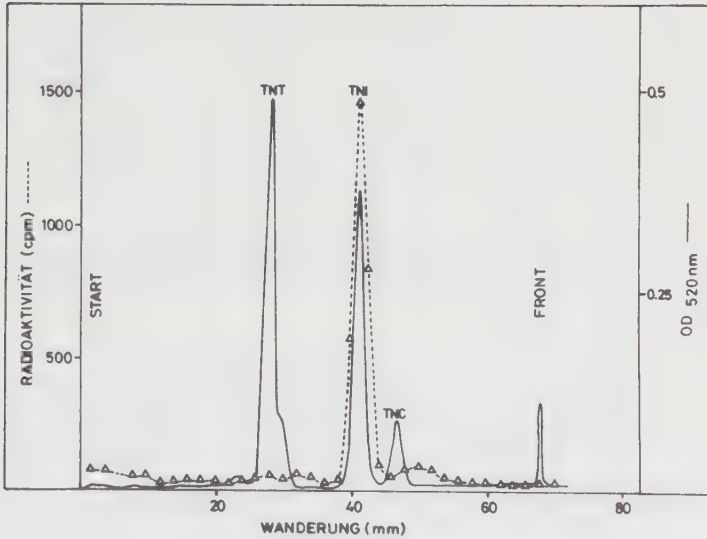


Abb. II: Lokalisation des mit cAMP-abhängiger Protein-Kinase eingebauten Phosphates in Troponin

Die Untereinheit des Troponin I wurde wie unter 2.1.10. beschrieben, phosphoryliert.

50 µg phosphoryliertes Troponin wurde wie unter 2.2.1. erwähnt, elektrophoretisch getrennt und analysiert.

Sonstige Angaben und Bedingungen wurden im Text beschrieben.

2.2.2. Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (1951)

Die zu analysierende Probe wird mit 10 % Trichloressigsäure gefällt (5 % Endkonzentration) und 10 Minuten aufgestellt. Danach wird das gefällte Protein abzentrifugiert. Der Niederschlag wird in 0.5 ml 1 % SDS, 0.1 N NaOH aufgenommen. Der Proteingehalt wird im Technicon-Auto-Analysator nach einer modifizierten Methode von LOWRY et al. (1951) bestimmt.

Als Standard dienen Lösungen von Rinderalbumin bekannter Konzentration.

2.2.3. Messung der Radioaktivität im Flüssigkeitszintillationszähler

Die Radioaktivitäts-Messungen werden im Packard-Flüssigkeits-Szintillationszähler durchgeführt. Folgende Szintillationslösungen werden verwendet:

A. Szintillator auf Naphthalin-Dioxan-Basis

21.84 g 2.5-Diphenyloxazol

2.16 g 1.4-Di-(2 Methylstyryl-)Benzol

375 g Naphthalin

3 l Dioxan

B. Szirtillator auf Toluol-Basis

21.84 g 2.5-Diphenyloxazol

2.16 g 1.4-Di-(2-Methylstyryl-)Benzol

2 l Toluol

2.2.4. Aktivitätsbestimmungen der Phosphorylase
(nach HASCHKE und HEILMEYER 1972)

Die Aktivität der Phosphorylase a und b wird im Technicon-Auto-Analysator (nach HASCHKE und HEILMEYER) bestimmt. Gemessen wird die Enzymaktivität in Richtung der Glykogensynthese als Freisetzung von anorganischem Phosphat.

Die Substratkonzentrationen betragen 1 % Glykogen, 75 mM Glucose-1-Phosphat. Für den Phosphorylase b-Test wird zusätzlich 1 mM AMP zugesetzt.

Eine Enzymaktivitätseinheit ist definiert als die Menge Phosphorylase, die 1 μ Mol Phosphat pro Minute freisetzt (30° C, pH 6.8).

2.2.5. Aktivitätsbestimmung der Phosphorylase Kinase nach JENNISSEN und HEILMEYER (1974)

Die Bestimmung der Enzymaktivität der Phosphorylase Kinase erfolgt über die Messung der Steigerung der Enzymaktivität der Phosphorylase im Test ohne AMP als Folge der Umwandlung der inaktiven b in die aktive a -Form. Die Substratkonzentrationen betragen: 5 mg Phosphorylase b /ml, 3 mM ATP, 20 mM Magnesiumacetat. Eine Enzymeinheit ist definiert als die Menge an Phosphorylase Kinase, die 1 μ Mol Phosphat pro Minute auf die Phosphorylase überträgt.

Einheiten Phosphorylase Kinase/ml

$$\frac{\text{mM } P_a \times 40 \times 6 \times 10 \times \text{verd.}}{8,4 \times t \times 50}$$

2.2.6. Phosphorylase-Phosphatase-Aktivitätstest modifiziert nach HASCHKE et al. (1970)

0.1 ml Probe (in der Regel drei Verdünnungen in 50 mM Tris/HCl, 1 mM DTE, 0.1 mM MnCl_2 (pH 7.5)) werden mit 0.1 ml ^{32}P -markierter Phosphorylase a (2.5 mg/l in 50 mM Tris/HCl, 0.1 mM MnCl_2 , 1 mM DTE pH 7.5) im Wasserbad bei 30° C für 15 Minuten inkubiert. Es werden 0.1 ml Rinderserum-Albumin-Lösung (25 mg/ml) zugegeben und die Reaktion wird durch Fällern des Proteins mit 0.7 ml 10 %iger

Trichloressigsäure gestoppt. Der Niederschlag wird nach 10 Minuten Inkubationszeit bei 0° C bei 3000 x g abzentrifugiert. Vom Überstand werden je 0.5 ml zur Bestimmung des freigesetzten radioaktiven Phosphats (C_{pm_Probe}) in 5 ml Szintillationslösung A (siehe unter 2.2.3.) zugegeben.

Die Gesamtradioaktivität der verwendeten Phosphorylase a (C_{pm_Total}) wird bestimmt, indem man im Testansatz die Phosphorylase-Phosphatase-Lösung durch 0.1 ml Puffer ersetzt und, wie oben beschrieben, abstoppt. 0.5 ml des Überstandes dieser Probe werden zur Ermittlung des Blindwertes (C_{pm_0}) entnommen; der zentrifugierte Niederschlag wird in 1 ml 0.1 N NaOH aufgelöst. Davon wiederum werden 0.5 ml zur Radioaktivitätsmessung verwendet (C_{pm_Total}). Die Phosphorylase-Phosphatase-Aktivität wird nach folgender Formel berechnet:

Einheiten Phosphorylase-Phosphatase:

$$\frac{(C_{pm_Probe} - C_{pm_0}) \times 25 \times \text{Verdünnungsfaktor}}{(C_{pm_Total} - C_{pm_0}) \times \text{Min}} = E/ml$$

Eine Phosphatase-Aktivitätseinheit ist definiert als die Menge Enzym, die unter den angegebenen Testbedingungen 1 nMol ^{32}P -Phosphat pro Minute freisetzt.

2.2.7. Bestimmung der Troponin-Phosphatase-Aktivität

0.1 ml Probe wird in 50 mM Tris, 1 mM DTE, 0.1 mM Mn^{2+} (pH 7.5) verdünnt und mit 0.1 ml ^{32}P -markierten Troponins für 10 Minuten bei 30° C inkubiert. In Zeitabständen von 30 Sekunden werden 25 µl aus diesem Ansatz auf Glasfilter-Papierplättchen (Whatman GF/C, Durchmesser 2,5 cm) pipettiert. Die Plättchen werden sofort in 10 % TCA, 1 % $Na_4P_2O_7$, 1 % K_2HPO_4 -Lösung gegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wird dieser Waschvorgang wiederholt. Danach wäscht man die Filterplättchen 20 Minuten in 10 % TCA, 10 Minuten in H_2O , Aceton und 5 Minuten in Äther.

Die Plättchen werden im Trockenschrank bei 60° C für 10 Minuten getrocknet, in Szintillationsgläschen gegeben und mit 5 ml Szintillationslösung auf Toluol-Basis (siehe unter 2.2.3.) versetzt. Die Radioaktivitätsmessung erfolgt im Packard-Liquid-Szintilationscounter für je 4 Minuten. Zur Bestimmung der totalen Radioaktivität des Troponin im Testansatz wird die Troponin-Phosphatase Lösung durch 0.1 ml Puffer ersetzt und, wie oben beschrieben, behandelt.

Eine Troponin-Phosphatase Einheit ist definiert als die Menge Enzym, die unter angegebenen Testbedingungen 1 nMol ^{32}P -Phosphat pro Minute freisetzt.

2.2.8. Bestimmung des Einbaus von ^{32}P -markiertem Phosphat während der Phosphorylierungsreaktion in Anlehnung an MANS und NOVELLI (1961)

25 - 50 μl Probe werden zu definierten Zeiten aus den Inkubationsansätzen für die Phosphorylierungsreaktion (siehe 2.1.9./2.2.10.) entnommen und auf Glasfiber-Plättchen (Whatman GF/C, $\varnothing$ 2.5 cm) aufgetragen.

Die Plättchen werden sofort in eine 10 % TCA, 1 % K_2HPO_4 , 1 % $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ -Lösung gegeben. Dabei präzipitiert das Protein und wird an den Glasfasern festgehalten, nicht proteingebundenes radioaktives Material bleibt dabei in Lösung.

Die Plättchen werden sofort in eine 10 % TCA, 1 % K_2HPO_4 , 1 % $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ -Lösung gegeben. Dabei präzipitiert das Protein und wird an den Glasfasern festgehalten, nicht proteingebundenes radioaktives Material bleibt dabei in Lösung.

Die Plättchen werden 15 Minuten bei 60°C getrocknet und anschließend werden sie in 5 ml Szintillationslösung B (siehe unter 2.2.3.) überführt.

Zur Bestimmung der insgesamt vorhandenen Radioaktivität wird ein ungewaschenes Plättchen verwendet.

2.2.9. Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration
FLODIN et al. (1961)

Die Molekulargewichtsbestimmung wird an einer (2.5 x 83 cm) Sepharose-6 B Säule, die mit 50 mM Tris, 1 mM DTE, 0.1 M NaCl, 0.1 mM Mn^{2+} (pH 7.5) äquilibriert ist, durchgeführt, indem man 0.5 ml Probe auf die Säule aufträgt. Die Durchflußgeschwindigkeit beträgt 50 ml/h. Der Durchlauf wird in 5.4 ml Fraktionen aufgefangen. Zur Bestimmung des Durchbruchvolumens V_o wird Dextran blau 2000, für das Totalvolumen Bromphenolblau verwendet.

Als Eichproteine dienen:

Eichproteine	Molekulargewicht	Elutionsvolumen
Ferritin	540 000	219 ml
Urease	473 000	232 ml
Katalase	240 000	270 ml
Aldolase	158 000	281 ml
Hämoglobin	645 000	337 ml
V_o Durchflußvolumen		135 ml
V_t Totalvolumen		389 ml
Gelvolumen		407 ml

Aus einer halblogarithmischen Auftragung des Molekulargewichts erhält man eine Eichgrade, aus der das Molekulargewicht bei gemessenem Elutionsvolumen bestimmt werden kann.

2.2.10. Proteinkinase-Aktivitätstest nach REIMANN
et al. (1971)

Es werden 0.05 ml 0.1 M GP/HCl (pH 6.0), 4 mM EDTA, 0.6 mM EGTA, 40 mM NaF, 4 mM Theophyllin, 20 mM Mg (Ac)₂, 0.1 ml Casein (15 mg/ml), 0.02 ml Protein Kinase, 0.01 ml cAMP (0.2 mM) zusammenpipettiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0.02 ml ATP- γ -³²P (2 mM, 25 Ci/Mol) gestartet. Nach gewünschter Inkubationszeit wird aus diesem Ansatz ein Aliquot auf ein Whatman-Filterplättchen gegeben und wie unter 2.2.8. beschrieben analysiert.

2.2.11. SDS-Gelelektrophorese nach WEBER und OSBORN (1969)

Zur Durchführung der Elektrophorese werden folgende Stammlösungen benötigt:

- I. 22.2 g Acrylamid
0.6 g Methylen- bis-Acrylamid
wird mit H₂O auf 100 ml aufgefüllt
- II. 60 mg Ammoniumperoxodisulfat
wird mit H₂O auf 4 ml aufgefüllt.
- III. 28.5 ml 1 M NaH₂PO₄
145 ml 0.5 M Na₂HPO₄
10 ml 10 % SDS
wird mit H₂O auf 500 ml aufgefüllt.

IV. Tetramethyläthylendiamin

Wir verwenden 7.5 %iges Gel folgender Zusammensetzung:

I.	6.75 ml
II.	1.0 ml
III.	10.0 ml
IV.	0.02 ml
H ₂ O	2.23 ml

Es werden die Lösungen I, III, IV und H₂O in eine Saugflasche pipettiert und vorsichtig entgast. Dann wird die Lösung II hinzugegeben. Das Gemisch wird in Gelröhrchen (6 mm Ø) gegossen und mit Wasser überschichtet.

Nach etwa 20 Minuten sind die Gele polymerisiert.

Lösung III dient als Badepuffer in der Elektrophoresekammer (1 : 2 verdünnt).

Der Probepuffer hat folgende Zusammensetzung:

1 % SDS, 0.01 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 1 % ME, 10 % Glycerin, 0.002 % Bromphenolblau.

Jeweils 0.05 ml Probepuffer werden mit der zu untersuchenden Proteinlösung oder Eichproteinen gemischt, für 3 Minuten bei 100° C erhitzt und auf ein Gel aufgetragen. Dabei erweist sich eine Proteinmenge von 2 - 5 µg pro zu erwartender Proteinbande als optimal. Als Eichprotein werden Phosphorylase Kinase mit ihren vier Untereinheiten

α (132.000), β (120.000), γ (45.000) und δ (17.800), Phosphorylase b (100.000) und Serumalbumin (68.000) benutzt.

Bei einer Laufzeit von ca. 4 Stunden bei Zimmertemperatur beträgt die Stromstärke 8 mA/Gel.

Folgende Färbelösung setzt man zur Färbung der SDS Gele an:

625 mg Coomassie-Brilliant-blau R-250 in 50 % Methanol (227 ml) zu 23 ml Essigsäure

Die Inkubationsdauer für die Gele in der Färbelösung beträgt etwa 2 Stunden. Die Entfärbung der Gele kann erfolgen:

- 1) elektrophoretisch in 7.5 % Essigsäure, 5 % Methanol bei 0.8 A für 15 Minuten
- 2) mit dem Ionenaustauscher Dowex 501 x 8
Essigsäure/Methanol-Gemisch im Schüttelapparat über Nacht.
- 3) mit Entfärbelösung in Reagenzgläsern (7.5 % Essigsäure, 5 % Methanol unter mehrfachem Wechsel der Lösung).

Die Proteinbanden auf den Gelen werden durch Messung der optischen Dichte bei 550 nm im Gelscanner bestimmt.

2.2.12. SDS-Disk-Elektrophorese nach NEVILLE (1971)

Folgende Stammlösungen werden bei der Elektrophorese verwendet:

- A) 30 % Acrylamid/6 % Methylen-bis-Acrylamid
- B) 0.108 M Tris/H₂SO₄ (pH 6.1)
- C) 0.850 M Tris/HCl (pH 9.18)
- D) Tetramethyläthylendiamin
- E) Ammoniumperoxodisulfat (15 mg/ml)

Das Sammelgel und Laufgel werden nach folgendem Pipettierplan gegossen:

	<u>3 % Sammelgel</u>	<u>10 % Laufgel</u>
A)	2.0 ml	6.6 ml
B)	10.0 ml	-
C)	-	10.0 ml
D)	0.02 m.	0.02 ml
E)	1.0 ml	1.0 ml
H ₂ O	7.0 ml	2.4 ml

Die Lösung C wird 1 : 2 verdünnt und als Anodenpuffer verwendet.

Als Kathodenpuffer dient folgender Ansatz (1 : 10 verdünnt):

0.40 M Borsäure

0.41 M Tris/HCl (pH 8.64)

1 % SDS

Die Proben bzw. homogenisierten Gelscheibchen werden über Nacht gegen dest. Wasser dialysiert.

Das Dialysat nimmt man in 0.108 M Tris/H₂SO₄, 1 % SDS, 3 mM DTE, 10 % Glycerin, 0.005 % Bromphenolblau (ph 6.1) auf und erhitzt bei 100° C für 5 Minuten. Der Rückstand wird auf die Gelröhrchen aufgebracht.

Die Elektrophoresekammern werden mit entsprechenden (oben genannten) Puffern aufgefüllt. Zum Ankonzentrieren der Proben auf dem Sammelgel wird eine Stromstärke von 0.5 mA pro Gel, für den Lauf eine Stromstärke von 1.5 mA pro Gel eingestellt.

Die Laufzeit beträgt bei Zimmertemperatur etwa 4 Stunden. Die Färbung und Entfärbung der Gele erfolgt in gleicher Weise wie unter 2.2.11. beschrieben.

2.2.13. Disk-Elektrophorese nach HEDRICK und SMITH (1968)

Zur Durchführung der Elektrophorese werden folgende Stammlösungen benötigt:

- A) 0.48 M Tris/HCl (pH 7.9)
- B) 20 g Acrylamid mit
0.66 g N-N-Methylenbisacrylamid wird mit bidest. H₂O
auf 100 ml aufgefüllt
- C) Tetramethyläthylendiamin
- D) 60 mg Ammoniumperoxodisulfat
wird mit H₂O auf 4.0 ml aufgefüllt.

Vorlaufpuffer: 0.48 M Tris/HCl (pH 7.9)
3 mM Cystein

Auftragungspuffer: 50 mM Tris, 20 mM ME, 20 % Sucrose,
0.02 % Bromphenol blau (pH 7.3)

Laufpuffer: 0.034 M Asparagin/Tris, 3 mM Cystein (pH 7.3)

Es werden 7.5 %ige Gele folgender Zusammensetzung verwendet:

- A) 2.5 ml
- B) 7.5 ml
- C) 0.01 ml
- D) 1.0 ml
- H₂O 9.0 ml

Die Lösungen A, B, C, H_2O werden in einer Saugflasche zusammenpipettiert und im Wasserstrahlvakuum entgast. Dann wird die Lösung D hinzugefügt. Das Gemisch wird in ein Gelröhrchen (7 mm $\emptyset$) gegossen und mit H_2O überschichtet. Nach etwa 30 Minuten sind die Gele polymerisiert.

Zur Entfernung von Radikalen läßt man die Gele für ca. 4 Stunden im Vorlaufpuffer (wie oben beschrieben) bei einer Stromstärke von 2 mA/Gel laufen. Dann wird die eigentliche Elektrophorese mit Laufpuffer (siehe oben) durchgeführt.

Es werden 100 - 200 μ g Protein mit 100 μ l Auftragspuffer vermischt und aufgetragen.

Bis das Protein ins Gel eingelaufen ist, wird eine Stromstärke von 2 mA/Gel angelegt, dann erhöht man diese auf 3 mA. Die Laufzeit beträgt ca. 4 Stunden bei 4⁰ C.

Zur Färbung werden die Gele ca. 15 Minuten in 1 % Amidoschwarz, 7.5 % Essigsäure, 5 % Methanol inkubiert.

Die Entfärbung erfolgt für 10 Minuten elektrophoretisch mit 7.5 % Essigsäure, 5 % Methanol bei 0.8 A Stromstärke.

2.2.14. Lokalisation der Enzymaktivität in den Polyacrylamidgelen

Nach Beendigung des Laufes der Elektrophorese der Polyacrylamidgele nach HEDRICK und SMITH (1968) werden die Gele im Gilson GF-Gelfraktionator in 2 mm Scheibchen geschnitten, homogenisiert und in 50 mM Tris, 1 mM DTE, 0.1 mM Mn^{2+} (pH 7.5) aufgenommen. In den Fraktionen werden die TNI-, TNT- und Phosphorylase-Phosphatase Aktivität, wie unter 2.2.6./2.2.7. beschrieben, getestet.

Durch Vergleich mit einem mit 1 %iger Amidoschwarz-Lösung gefärbten Gel können die Aktivitätsgipfel den einzelnen Proteinbanden zugeordnet werden.

2.2.15 Messung der NaCl Konzentration in den Fraktionen durch die Leitfähigkeit

Zur Bestimmung der NaCl-Konzentration wird in den Fraktionen folgendermaßen vorgegangen: Es wird eine Eichgerade aufgestellt, in der die NaCl Konzentration von 50 - 500 mM NaCl in 50 mM Tris, 1 mM DTE, 0.1 mM Mn^{2+} (pH 7.5) eingestellt, die Proben 1 : 100 verdünnt und die Leitfähigkeit gemessen werden.

Aus den Fraktionen werden ebenfalls Proben entnommen und 1 : 100 verdünnt und im Radiometer CD M3 Conductivity-Meter die Leitfähigkeit und damit der Verlauf des Gradienten bestimmt.

2.2.16. Programm Hyper (modifiziert nach CLELAND (1967))

Die Berechnung des Programms wurde am Großrechner des Rechenzentrums der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt. Das Programm dient der Ermittlung der Parameter K_m und $V_{\max}$ der Michaelis-Menten-Funktion

$$v = \frac{V_{\max} \times (S)}{K_m + (S)}$$

wobei v die Reaktionsgeschwindigkeit und (S) die Konzentration eines Substrates ist (MICHAELIS et al. 1913).

Zur Ermittlung von K_m und $V_{\max}$ sind seit langem Methoden üblich, die durch geeignete Umformung der Michaelis-Menten Gleichung eine "Linearisierung" und damit eine einfache Extrapolierbarkeit der Funktion erreichen, z.B. nach LINEWEAVER und BURK (1934). Die Parameter können entweder durch graphische Extrapolation oder rechnerisch durch lineare Regression nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate ermittelt werden. Die graphische Auswertung liefert jedoch kein Maß für die Zuverlässigkeit der ermittelten Parameter. Darüber hinaus sind die "linearisierenden" Methoden generell mit dem Problem belastet, daß die "Verzerrung" der Hyperbel zu einer Geraden auch mit einer Verzerrung der Varianz der Kurve in ihrem Verlauf einhergeht. Diese führt zur Notwendigkeit einer unterschiedlichen Gewichtung der Meßpunkte in der linearen Extrapolation bzw. Regression, die aber, zumal bei der graphischen Auswertung, nicht berücksichtigt wird.

Mit der Durchführung einer nichtlinearen Regressionsrechnung werden beide Probleme vermieden.

Das Prinzip der Methode ist durch WILKINSON et al. (1961) und CLELAND et al. (1967) ausführlich beschrieben worden.

Als Ergebnis liefert es die Parameter K_m und V_{max} und ihre Standardabweichung.

2.2.17. Atomabsorptionsspektrometrische Messungen der Mn²⁺ Konzentration

Die Messungen werden mit dem Atomabsorptionsspektrometer FMD 3 von Zeiss durchgeführt. Das Gerät ist mit einer Graphitrohrküvette Perkin-Elmer HGA 74 ausgerüstet, die Aufzeichnung der Meßsignale erfolgt mit einem Hochempfindlichkeitsschreiber (Radiometer RFC 61/REA 112). Das Probenvolumen (10 - 50 µl) wird mit einer Eppendorf Kolbenpipette in das Graphitrohr eingebracht. Die Probe wird durch einen Temperaturgradienten von 20° C auf 300° C in 11 sec. eingedampft. 20 sec. lang bei 900° C zersetzt (hierbei werden organische und flüchtige Bestandteile der Lösung weitgehend entfernt) und schließlich 15 sec. bei 2700° C atomisiert. Das Extinktionsmaximum ist nach Zehntelsekunden erreicht, die übrige Zeit bei 2700° C dient dem Ausheizen. Das Signal wird mit dem Schreiber aufgezeichnet. Der maximale Ausschlag ist ein direktes Maß für die Substanzmenge, Planimetrie des Extinktionssignals über alle 15 sec. ergibt kein anderes Resultat als die Messung der Signalthöhe. Der die Reproduzierbarkeit der Messung begrenzende Faktor ist die Pipettiergenauigkeit. Bei einem Probenvolumen von 10 µl sind die Eichkurven bis 1 µM Mn²⁺ linear; Proben höherer Konzentration müssen verdünnt werden. Die Nachweisgrenze liegt bei 1 nM für Mn²⁺. Als Eichlösungen dienen Titrisol-Lösungen, die im Puffer des jeweiligen Experiments verdünnt werden.

3. ERGEBNISSE

3.1. Charakterisierung der phosphorylierten Substrate

Folgende phosphorylierte Proteine wurden hergestellt: Phosphorylase a, sowie die phosphorylierten Untereinheiten TNI-P und TNT-P des Troponins. Die Phosphorylierung der isolierten homogenen Phosphorylase b, die dabei in die a-Form überführt wird, wurde durch Ca^{2+} -abhängige Protein Kinase, in Gegenwart von Mg^{2+} und $\text{ATP-}\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ wie unter 2.1.3. beschrieben, katalysiert. Im Durchschnitt wurden 75 % der Phosphorylase b in die aktive a-Form überführt. Die Einbaurate betrug 1 Mol Phosphat 100.000 g Phosphorylase. Als weitere Substrate verwendeten wir Holotroponin (isoliert nach SPERLING 1978), das die drei Untereinheiten TNT, TNI und TNC enthält und die im Gesamtkomplex in einer Stöchiometrie von 1 : 2 : 1 enthalten sind. Die Tropomyosin bindende Untereinheit TNT (GREASER und GERGELY 1971) mit einem Molekulargewicht von 30500 (PEARLSTONE et al. 1977) wurde durch Ca^{2+} abhängige Protein Kinase in Anwesenheit von $\gamma\text{-}^{32}\text{P-ATP/Mg}^{2+}$ phosphoryliert (siehe unter 2.1.9.).

Die Aktomyosininhibitor Untereinheit des Troponins, TNI (PERRY et al. 1972 und WILKINSON et al. 1972), mit einem Molekulargewicht von 20900 (WILKINSON und GRAND 1975) wurde durch cAMP abhängige Protein Kinase, wie unter 2.1.10. beschrieben, phosphoryliert. Die Ca^{2+} bindende Untereinheit TNC (HARTSHORNE und PYAN 1971) mit einem Molekulargewicht von 17900 (van EERD und TAKAHASHI 1975) ist nicht phosphorylierbar.

Durch Ca^{2+} abhängige Protein Kinase in Anwesenheit von ca. 10^{-5} M Ca^{2+} wurden 0.11 Mol Phosphat in die TNT Untereinheit des Troponins eingebaut. Mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Protein Kinase wurden 0.40 Mol Phosphat/Mol Troponin eingebaut.

Der molare Phosphateinbau war gewissen Schrankungen unterworfen. Zur Berechnung des Phosphatausbaus wurde von einem Molekulargewicht von 90000 für Troponin ausgegangen.

Die auf diese Weise phosphorylierte Phosphorylase a sowie Troponin an den beiden Untereinheiten I und T wurden als Substrate der Protein Phosphatasen verwendet.

3.2. Herstellung des Rohextraktes aus Kaninchen Skelettmuskel

Ein weißes Kaninchen (Neuseeländer) ließ man nach der Betäubung durch 2.5 ml Evipan entbluten und nach der Enthäutung wurde es 20 Minuten in Eiswasser inkubiert. 100 g Skelettmuskelfleisch werden herauspräpariert, im Fleischwolf zerkleinert und mit 250 ml 20 mM Tris, 0.1 mM MnCl_2 , 4 mM EGTA, 1 mM DTE, 1×10^{-5} M PMSF versetzt und auf pH 7.0 eingestellt.

Diese Mischung wurde im Waring-Blendor 2.5 Minuten homogenisiert. Das Homogenat wurde 40 Minuten bei 15000 x g zentrifugiert, der Überstand über Glaswolle filtriert und mit dem gleichen Volumen Sucrose-Puffer (40 % Sucrose, 4 mM EGTA, 0.1 mM PMSF, 2 mM DTE, 0.2 mM MnCl_2 , 20 mM GP pH 7.0) versetzt. Der so gewonnene Rohextrakt wurde zur Optimierung der hydrophoben Chromatographie sowie zur weiteren Anreicherung verwendet. Die Extraktion sowie alle nachfolgenden Reinigungsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

3.3. Bestimmung der Aktivität der Protein-Phosphatasen und Anreicherung über hydrophobe Chromatographie

Die Messung der Protein-Phosphatase Aktivitäten wurden wie unter 2.2.6./2.2.7. beschrieben, bei pH 7.5 (30° C) in Anwesenheit von 0.1 mM Mn^{2+} und drei verschiedenen Enzymkonzentrationen durchgeführt, um die Linearität zwischen Aktivität und Enzymkonzentration zu prüfen. Die Inkubationszeit wurde so gewählt, daß die Dephosphorylierung der Substrate maximal 50 % betrug. Die Abb. III zeigt die Kinetiken der Dephosphorylierung der TNT- und der TNI-Untereinheiten des Troponins sowie der Phosphorylase a.

Die Aktivitäten beider Troponin-Phosphatasen wurden, wie unter 2.2.7. beschrieben, aus der Initialgeschwindigkeit der Dephosphorylierungsreaktion bestimmt.

Aktivitätsverhältnisse wurden in Bezug auf Phosphorylase-Phosphatase angegeben und als Quotienten von Phosphorylase a zu TNT- und Phosphorylase a zu TNI-Phosphatase Aktivität berechnet und angegeben.

Rohextrakt wurde über Methylamin Sepharose chromatographiert und die adsorbierten Phosphatasen mit NaCl eluiert. Die Protein-Phosphatase Aktivitäten wurden, wie oben beschrieben, getestet. Die Tab. 1 zeigt die Aktivitäten der Protein-Phosphatasen, getestet mit allen drei genannten Substraten. Mit dieser hydrophoben Chromatographie wurden alle drei Protein-Phosphatasen parallel angereichert bei einer Enzymausbeute von 65 - 80 %. 35 % der Phosphorylase, 2 % der TNI- und 0.7 % der TNT-Phosphatase Aktivität wurde im Durchlauf gemessen.

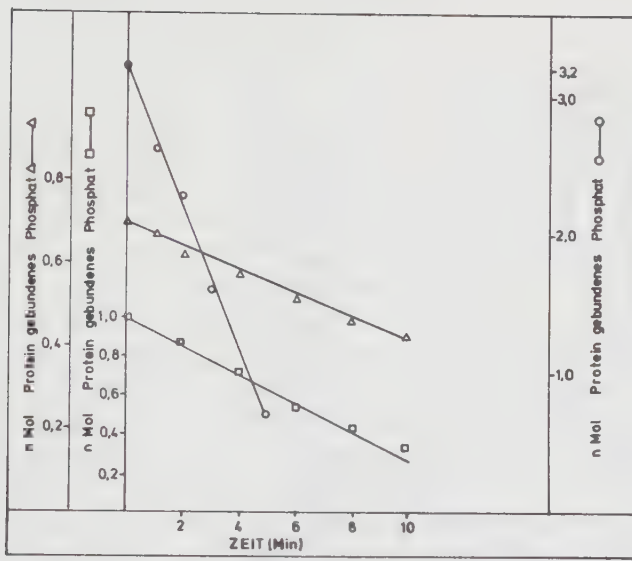


Abb. III: Dephosphorylierung der phosphorylierten Substrate durch Protein-Phosphatasen im Rohextrakt.

Die Kinetik der Phosphatfreisetzung wurde in einem Ansatz von 0.2 ml bei einer Substratkonzentration von 1.2 mg/ml und einer Protein-Phosphatasen Konzentration (Rohextrakt) von 0.4 mg/ml wie unter 2.2.6./2.2.7. beschrieben, bestimmt. Sonstige Bedingungen wurden im Text beschrieben.

Dephosphorylierung von Phosphorylase a -○-

Dephosphorylierung von TNT-P -□-

Dephosphorylierung von TNI-P -△-

Material	Phosphorylase-Phosphatase		TNT-Phosphatase		TNI-Phosphatase	
	spezifische Aktivität	Ausbeute	spezifische Aktivität	Ausbeute	spezifische Aktivität	Ausbeute
	E/mg	%	E/mg	%	E/mg	%
Rohextrakt	0.50	100	0.10	100	0.15	100
Durchlauf	0.22	35	0.003	2.0	0.002	0.7
Eluat	12.8	65	3.14	80	4.55	69

Tab. 1: Adsorption der Protein-Phosphatasen an Methylamin Sepharose aus Rohextrakt

Der Rohextrakt wurde, wie unter 3.2. beschrieben, hergestellt und an eine Methylamin substituierte Sepharose 4-B Säule (12 μ Mol/ml gepackte Sepharose) von 2.5 x 20 cm äquilibriert mit 4 mM EGTA, 1 mM DTE, 0.5 mM PMSF, 0.1 mM Mn^{2+} und 20 % Sucrose (pH 7.0) chromatographiert. Adsorbiertes Protein wurde durch 200 mM NaCl eluiert. Die Protein-Phosphatase Aktivitäten wurden wie unter 2.2.6./2.2.7. angegeben, in Rohextrakt, Säulendurchlauf und Eluat getestet.

3.4. Optimierung der hydrophoben Chromatographie zur Anreicherung von Protein-Phosphatasen

Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt wurde, lassen sich alle drei Protein-Phosphatasen durch hydrophobe Chromatographie anreichern. Die Optimierung erfolgt nach der von JENNISSEN und HEILMEYER (1975) beschriebenen Methode. Dabei wurden die Protein-Phosphatasen an verschiedene hydrophobe Matrices, Methylamin substituierte Sepharosen, wie in Methoden beschrieben, gebunden und mit NaCl wieder eluiert.

Da die Kapazität des hydrophoben Gels von der Alkylgruppendichte abhängig ist, war es erforderlich, in Vorversuchen die geeignete Methylaminkonzentration pro ml gepackte Sepharose zu finden, um die Protein-Phosphatasen optimal zu adsorbieren und wieder eluieren zu können. Zu diesem Zweck wurde durch Erhöhung der BrCN-Konzentration bei der Aktivierung der Sepharose die gebundene Menge Methylamin kontinuierlich erhöht; sie betrug 4.3 - 18 μ Mol Methylamin pro ml gepackte Sepharose. Die Bindungskapazität der Gele wurde folgendermaßen bestimmt:

Auf sechs mit verschiedenen substituierten Alkylamin Sepharose Säulen (2.5 x 15 cm), die mit 10 mM GP, 1 mM DTE, 2 mM EGTA, 0.05 mM PMSF, 0.1 mM Mn^{2+} pH 7.0 (Puffer A) voräquilibriert waren, wurde 50 ml Rohextrakt (siehe 3.2.) aufgetragen und mit dem 10-fachen Säulenvolumen Puffer A gewaschen. Die Elution erfolgte durch 200 mM NaCl. Da alle drei Protein Phosphatasen in etwa gleichem Verhältnis angereichert werden könnten (siehe Tab. 8), wurde in diesem Versuch nur die Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase getestet. Die Abb. IV zeigt, daß an Gele mit einer Alkylgruppendichte von weniger als 4.5 μ Mol Methylamin/ml Sepharose keine Phosphorylase-Phosphatase gebunden wurde. Danach steigt die Menge des gebundenen Enzyms mit der Alkylgruppendichte an, bis bei 12 μ Mol/ml Sepharose eine Sättigung der Adsorption erreicht

wird. Bei diesem Substitutionsgrad wurden 82 % der Phosphorylase-Phosphatase Aktivität am Gel adsorbiert.

Nach Elution wurde die Phosphorylase-Phosphatase ca. 20fach angereichert und dabei wurde eine spezifische Aktivität von 13.5 E/mg erhalten. 13.5 % der Enzym Aktivität konnte im Durchlauf nachgewiesen werden (siehe Tab. 2).

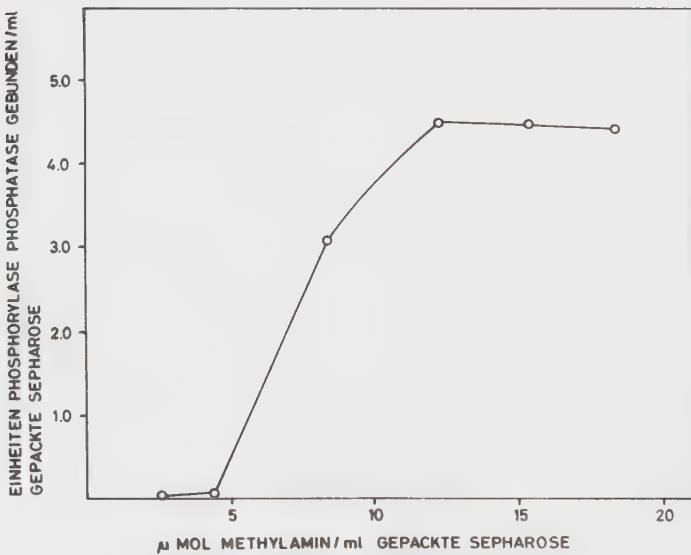


Abb. IV: Bindungskapazität von Methylamin substituiertter Sepharose 4-B als Funktion der Methylamin Beladung des Gels für Phosphorylase-Phosphatase aus Kaninchen Skelettmuskel.

Die Herstellung von Methylamin Sepharose sowie die Bestimmung ihres Substitutionsgrades wurde, wie unter 2.1.6. beschrieben, durchgeführt. Die Kapazität der Gele für Phosphorylase-Phosphatase wurde, wie in Text und Methoden beschrieben, getestet.

μ Mol Methylamin/ml gepackte Sepharose		4.2	8.2	12.0	15.0
Durchlauf	Spezifische Aktivität E/mg	0.55	0.22	0.135	0.18
	Ausbeute %	67	30	17	21
Eluat	Spezifische Aktivität E/mg	-	9.22	13.5	13.2
	Ausbeute %	2.0	69	82	79

Tab. 2: Adsorption der Phosphorylase-Phosphatase aus Rohextrakt an Methylamin Sepharosen mit steigender Alkylgruppendichte.

50 ml Rohextrakt, 0.69 E/mg, wurde an je eine mit steigender Alkylgruppendichte substituierte Sepharose 4 B Säule (2.5 x 40 cm), äquilibriert mit 10 mM GP, 2 mM ECTA, 1 mM DTE, 0.05 mM PMSF, 0.1 mM Mn^{2+} und 20 % Sucrose (pH 7.0) chromatographiert. Jede Säule wurde mit dem 10-fachen Volumen des oben genannten Puffers gewaschen und mit 200 mM NaCl eluiert.

Weitere Angaben wurden im Text beschrieben.

Bei einer höheren Methylaminkonzentration wird auf dem Gel die Hydrophobizität höher, so daß das Enzym stärker gebunden wird und sich nur noch mit sehr hohen Salzkonzentrationen eluieren läßt, wobei eine große Menge Fremdprotein miteluert wird.

Für die Reinigung der Protein-Phosphatasen wurde ein Gel von 12 - 15 μ Mol Methylamin/ml gepackte Sepharose verwendet.

Die Tab. 1 zeigt zum Vergleich die Anreicherung sowie die Ausbeute der drei Phosphatasen bei diesem Reinigungsschritt.

3.5. Erprobung einiger konventioneller Methoden zur Reinigung der Phosphorylase-Phosphatase

Für die folgenden Versuche wurde partiell angereicherte Phosphorylase-Phosphatase (S_{II} Fraktion s. unter 3.6.2.) verwendet.

3.5.1. Ammoniumsulfat Fällung

Zu Phosphorylase-Phosphatase wurden steigende Mengen Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 25 - 64 % Sättigung gegeben, für 15 Minuten bei 0° C inkubiert und 15 Minuten bei 5000 x g abzentrifugiert. Der Überstand sowie der Niederschlag wurden gegen 50 mM Tris, 1 mM DTE, 0.1 mM Mn^{2+} pH 7.5 dialysiert und die Aktivität der Phosphorylase Phosphatase wurde wie unter 2.2.6. angegeben bestimmt.

Ammonium Sulfat Sättigung	Ü b e r s t a n d			N i e d e r s c h l a g		
	Aktivität	Spezifische Aktivität	Aktivitäts Ausbeute	Aktivität	Spezifische Aktivität	Aktivitäts Ausbeute
%	Einheiten	E/mg	%	Einheiten	E/mg	%
0	2.92	1.72	100	-	-	-
24.4	2.62	2.0	89.7	0.11	2.97	3.8
28.5	3.0	2.0	103	0.37	3.15	12.6
35.2	2.30	1.7	78.7	1.0	3.38	34.2
42.7	1.24	1.39	42.7	1.88	3.03	64.3
51.2	0.315	0.40	10.7	2.68	3.67	91.7
56.9	0.11	-	3.7	2.62	2.90	89.7
64.0	-	-	-	2.59	2.64	88.6

Tab. 3: Verteilung der Enzym Aktivität im Überstand und Niederschlag bei Ammoniumsulfat Fällung

Die Tab. 3 zeigt, daß durch eine Ammoniumsulfat Konzentration von 51 % Sättigung 92 % Enzym Aktivität bei einer Protein Ausbeute von 43 % sedimentierten, dabei wurde die Phosphorylase-Phosphatase zweifach angereichert. Das so gewonnene Enzym erwies sich jedoch nach einer in präparativem Maßstab durchgeführten Ammoniumsulfatfällung als instabil.

3.5.2. Isoelektrische Fällung

Phosphorylase-Phosphatase wurde durch Zugabe von 0.1 N Essigsäure von pH 7.5 schrittweise bis auf pH 3.0 gebracht, für 20 Minuten bei 0° C inkubiert und 15 Minuten bei 5000 x g abzentrifugiert. Der Überstand sowie der Niederschlag wurden gegen 50 mM Tris, 1 mM DTE, 0.1 mM Mn^{2+} , pH 7.5, dialysiert und die Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase wurde, wie unter 2.2.6. angegeben, bestimmt.

Die Tab. 4 zeigt, daß mit sinkendem pH Wert die Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase im Überstand abnimmt. Im Niederschlag wurden zwei Optima festgestellt: a) zwischen pH 5.2 - 4.4 und b) zwischen pH 7.5 - 6.4. Die spezifische Aktivität des Enzyms im Überstand nahm bei pH Werten von kleiner als 5 stark ab. Eine Anreicherung des Enzyms durch Fällung bei niedrigeren pH Werten wurde nicht erzielt, da die spezifische Aktivität im Niederschlag immer geringer war als im Überstand.

	Überstand			Niederschlag		
PH	Aktivität	Spezifische Aktivität	Aktivität Ausbeute	Aktivität	Spezifische Aktivität	Aktivität Ausbeute
	Einheiten	E/mg	%	Einheiten	E/mg	%
7.5	2.62	5.5	100	0.15	4.4	5.0
7.0	2.68	6.2	102	0.11	2.16	4.0
6.4	1.6	5.3	61	0.16	6.1	6.0
5.9	1.25	4.8	48	0.09	3.4	3.0
5.2	0.83	4.2	31	0.40	2.9	15.0
4.4	0.04	0.59	1.5	0.71	2.0	27.0
3.2	0.07	0.74	2.6	0.01	0.04	0.5

Tab. 4: Verteilung der Enzym Aktivität im Überstand und Niederschlag bei isoelektrischer Fällung

3.5.3. Äthanol Fällung

Phosphorylase-Phosphatase wurde mit steigenden Mengen Äthanol (Endkonzentration 0 - 50 %) versetzt und für 20 Minuten bei 0° C inkubiert. Die Zentrifugation erfolgte bei 5000 x g für 15 Minuten. Die Aktivität des Enzyms wurde, wie unter 2.2.6. angegeben, bestimmt.

Mit steigender Äthanol Konzentration nahm die spezifische Aktivität des Enzyms im Überstand ab, während sie im Niederschlag annähernd konstant blieb (siehe Tab. 5).

Bei 50 % Äthanol konnte im Überstand eine Abnahme der spezifischen Aktivität des Enzyms um den Faktor 3 beobachtet werden, aber 61 % der Aktivität gingen verloren.

3.5.4. Aceton Fällung

Das Enzym wurde mit steigenden Aceton Mengen versetzt, für 20 Minuten bei 0° C inkubiert und bei 5000 x g 15 Minuten abzentrifugiert. Die Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase wurde; wie unter 2.2.6. angegeben, bestimmt. Die spezifische Aktivität des Enzyms im Überstand blieb bei einer Aceton Konzentration von 0 - 40 % nahezu unverändert, eine leichte Aktivierung um 20 % konnte festgestellt werden. Bei weiterer Erhöhung der Aceton Konzentration fiel das gesamte Enzym aus. Eine Zunahme der spezifischen Aktivität konnte aber nicht beobachtet werden (siehe Tab. 6).

Äthanol	Ü b e r s t a n d			N i e d e r s c h l a g		
	Aktivität	Spezifische Aktivität	Aktivitäts Ausbeute	Aktivität	Spezifische Aktivität	Aktivitäts Ausbeute
	Einheiten	E/mg	%	Einheiten	E/mg	%
%						
0	39.3	23.7	100	-	-	-
10	35.1	21.1	89	0.64	13.3	1.6
20	29.0	17.5	73.8	0.45	12.1	1.1
30	22.2	14.5	56.4	0.55	11.4	1.4
40	15.1	9.1	39.3	0.5	8.3	1.3
50	14.4	7.2	36.6	0.91	13.7	2.3

Tab. 5: Verteilung der Enzym Aktivität im Überstand und Niederschlag bei Äthanol Fällung

Aceton %	Überstand			Niederschlag		
	Aktivität	Spezifische Aktivität	Aktivitäts Ausbeute	Aktivität	Spezifische Aktivität	Aktivitäts Ausbeute
	Einheiten	E/mg	%	Einheiten	E/mg	%
0	14.4	66	100	-	-	-
10	17.3	66.5	124	0.43	14.8	2.9
20	17.1	72.7	108	0.55	28.9	3.8
30	16.8	66	117	0.86	45.2	5.9
40	13.3	56.5	108	1.49	30.4	10.3
50	0.49	12.5	18.0	14.3	72.9	99.3

Tab. 6: Verteilung der Enzymaktivität im Überstand und Niederschlag bei Aceton Fällung

3.5.5. Ionenaustausch Chromatographie an DEAE Cellulose

3.0 ml Phosphorylase-Phosphatase (17.7 E/mg) wurden an einer DEAE Cellulose Säule (1 x 25 cm) äquibriert mit 50 mM Tris, 20 mM ME, pH 7.5, bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 10 ml/h adsorbiert.

Der Durchlauf wurde gesammelt und die Elution erfolgte durch einen linearen NaCl Gradienten von 0 - 1.0 M. Die Enzymaktivität sowie Proteinkonzentrationen wurden, wie unter 2.2.6./2.2.2. beschrieben, gemessen.

Bei dieser Chromatographie wurden die Enzymaktivität und das Protein parallel eluiert, die spezifische Aktivität des eluierten Enzymes war niedriger als die des aufgegebenen Enzyms und betrug 7.9 E/mg.

Chromatographie der Phosphorylase-Phosphatase an Phospho-Cellulose sowie an Hydroxylapatit brachte ebenfalls keine Reinigung des Enzyms, es wurde jedesmal eine Inaktivierung beobachtet.

3.5.6. Gelfiltration über Ultrogel ACA 34 und Sephadex G-100

5 ml Phosphorylase-Phosphatase (5 mg/ml) wurden an Ultrogel AcA 34 sowie Sephadex G-100 (2.5 x 50 cm), die jeweils äquibriert waren, mit 50 mM Tris, 1 mM DTE, 0.1 mM Mn^{2+} pH 7.5 bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 20 ml/h filtriert. Der Durchlauf wurde in 7.0 ml Fraktionen gesammelt.

Die Tab. 7 zeigt, daß die Phosphorylase-Phosphatase mit keiner der beiden Methoden angereichert werden konnte, sondern beide Gelfiltrationsmethoden führten zu einer Inaktivierung des Enzyms.

E n z y m	Aktivität	Spezifische Aktivität	Aktivitäts Ausbeute
	Einheiten	E/mg	%
Ausgangsmaterial	98	25	100
Ultrogelfiltrationsfraktion	6.6	1.0	6.2
Sephadex G-100 Filtrationsfraktion	2.2	6.2	2.2

Tab. 7: Verteilung der Enzym Aktivität bei der Gelfiltration

3.5.7. Sucrosegradienten Zentrifugation

Die Ultrazentrifugation der Phosphorylase-Phosphatase erfolgte in einem linearen Sucrosegradienten von 0.3 - 0.9 M bei 270000 x g für 4 Stunden. Die Verteilung der Aktivität des Enzyms sowie des Proteins über den Gradienten wurden, wie unter 2.2.6./2.2.2. angegeben, bestimmt.

Die Aktivität des Enzyms sowie das Protein sedimentierten parallel. Eine Anreicherung des Enzyms konnte nicht festgestellt werden. Bei diesem Schritt wurden 10 % der eingesetzten Phosphorylase-Phosphatase Aktivität wiedererhalten.

Alle oben genannten klassischen Reinigungsmethoden erwiesen sich somit als zur Anreicherung der Phosphorylase-Phosphatase ungeeignet.

3.6. Präparation und Reinigung der Protein-Phosphatasen aus Kaninchen Skelettmuskel

Im folgenden wird eine partielle Reinigung und Trennung der dabei genannten Protein-Phosphatasen beschrieben, die durch hydrophobe Chromatographie, Gelfiltration und Affinitätschromatographie an Histon Sepharose erreicht wird.

3.6.1. Hydrophobe Chromatographie an Methylamin Sepharose

Der Rohextrakt wurde aus 500 g Kaninchen Skelettmuskel, wie unter 3.2. beschrieben, hergestellt.

Der Rohextrakt wurde auf eine optimierte methylaminsubstituierte Sepharose Säule (5 x 100 cm), wie unter 3.4. beschrieben, aufgetragen und mit ca. 3 l Puffer A gewaschen.

Das Protein wurde mit 1500 ml eines linearen NaCl Gradienten (von 0 - 0.5 M) bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 1 l/h eluiert und in 9.0 ml Fraktionen gesammelt.

Zur besseren Übersichtlichkeit wurde in Abbildung V nur die Phosphorylase Phosphatase Aktivität aufgetragen. Es wurden aber, wie unter 3.6.2. beschrieben, alle drei Phosphatasen parallel angereichert. Im Eluat wurde die Aktivität der Protein Phosphatasen sowie die Phosphorylase Kinase, wie unter 2.2.6./2.2.5. beschrieben, getestet. Dieses Eluat enthielt ca. 700 E/ml Phosphorylase Kinase Aktivität, die durch einen späteren Reinigungsschritt abgetrennt wurde (s. Abb. VI).

Das Eluat wurde mit einer Hollowfiber Patrone (H 1D x 50) auf 1/10 des Anfangsvolumens ankonzentriert.

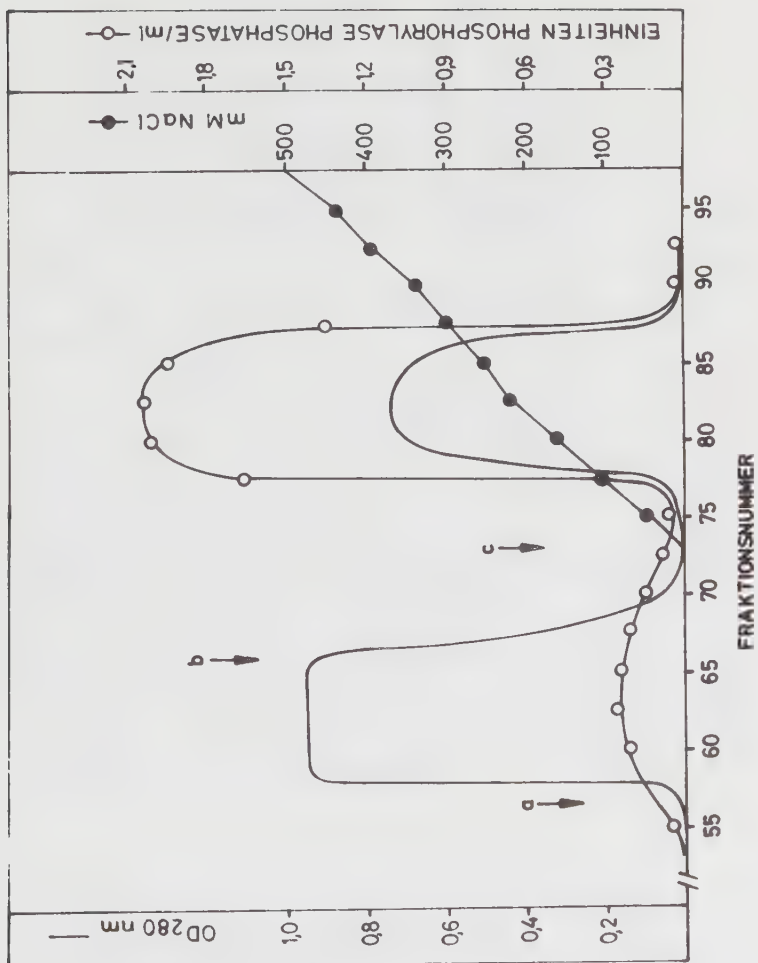


Abb. 5: Elutionsprofil der Muskel Phosphorylase-Phosphatase bei hydrophober Chromatographie.

Die Proteinkonzentration wurde im Durchflußphotometer bei 280 nm registriert. Die NaCl-Konzentration wurde durch Messung der Leitfähigkeit ermittelt (siehe unter 2.2.15.). Die Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase wurde, wie unter 2.2.6. angegeben, bestimmt.

Zum Zeitpunkt a wurde der Rohextrakt aus Kaninchenmuskel über die hydrophobe Säule gepumpt.

Ab Zeitpunkt b wurde mit Sucrose Puffer nachgewaschen, bis keine Absorption bei 280 nm mehr meßbar war.

Zum Zeitpunkt c wurde das gebundene Enzym eluiert. Die Fraktionen 78 - 88 wurden vereinigt und ankonzentriert.

Sonstige Bedingungen wurden im Text beschrieben.

3.6.2. Gelfiltration über Sepharose 6-B

Die Reinigung der Protein-Phosphatasen wurde durch Gelfiltration an Sepharose 6-B fortgesetzt.

Das ankonzentrierte Eluat der hydrophoben Chromatographie wurde über eine Sepharose 6-B Säule (5 x 80 cm), äquili-briert mit 50 mM Tris/HCl, 1 mM DTE, 0.1 mM $MnCl_2$, pH 7.5, aufgetragen und mit dem letztgenannten Puffer (Phosphatase Puffer) bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 90 ml/h fil-triert. Der Durchlauf wurde in 10 ml Fraktionen gesammelt. Es wurden Aliquots entnommen und die Aktivität der Phosphory-lase Kinase (siehe unter 2.2.5.), Glykogen Phosphorylase (siehe unter 2.2.4.), Phosphorylase-Phosphatase (siehe un-ter 2.2.6.) und der Troponin-Phosphatasen, wie unter 2.2.7. angegeben, bestimmt.

Die Abb. VI zeigt eine Trennung der Phosphorylase Kinase (Elutionsvolumen 600 - 1000 ml) von Protein-Phosphatasen (Elutionsvolumen 1000 - 1500 ml), hochmolekularen Proteinen und des Glykogens (Elutionsvolumen 450 - 650 ml). Keine Glykogen Phosphorylase konnte nachgewiesen werden. Die drei Phosphatasen zeigten ein identisches Elutionsvolumen, d.h. ein gleiches apparentes Molekulargewicht.

Die Protein-Phosphatasen wurden im Bereich von 1000 - 1400 ml Elutionsvolumen gesammelt und in einer Amicon Ultrafil-trationszelle über eine PM-10 Diaflow-Membran im Verhältnis 1 : 10 des Ausgangsvolumens ankonzentriert. Das Konzentrat wurde als S_{II} Fraktion bezeichnet.

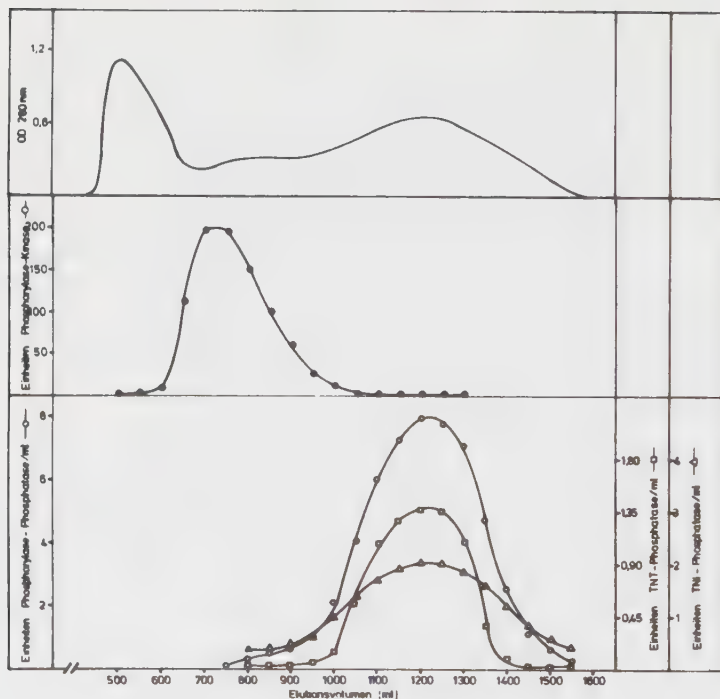


Abb. VI: Elutionsprofil der Protein-Phosphatasen bei Gelfiltration über Sepharose 6-B.

Das Proteinprofil wurde im Durchflußphotometer bei 280 nm registriert. Die Enzymaktivitäten wurden, wie unter 2.2.6./2.2.7. angegeben, getestet.

Die Puffer und sonstige Bedingungen wurden im Text beschrieben.

3.6.3. Chromatographie an Histon Sepharose

Die aus der Gelfiltration erhaltene S_{II} Fraktion wurde auf eine, wie unter 2.1.7. beschriebene, dargestellte Histon substituierte Sepharose Säule (2.5 x 20 cm) aufgetragen, die mit 50 mM Tris/HCl, 0.1 mM DTE, 0.1 mM Mn^{2+} , 0.05 mM PMSF pH 7.5 äquiliibriert war. Es wurde gewaschen, bis keine Adsorption bei 280 nm mehr zu beobachten war.

Die Protein-Phosphatasen wurden mit einem linearen NaCl Gradienten (1200 ml 0 - 0.5 M) und einer Durchflußgeschwindigkeit von 100 ml/h eluiert und in Fraktionen von 9.0 ml gesammelt.

Die Aktivität von Protein-Phosphatasen wurde, wie unter 2.2.6./2.2.7. beschrieben, getestet.

Die Fraktionen 44 - 51 wurden vereinigt und in einer Amicon Ultrafiltrationszelle über eine PM-10 Diaflow Membran im Verhältnis 1 : 20 ankonzentriert und bei $-30^{\circ}C$ aufbewahrt. Das Konzentrat wurde $S_{II}^{H_C}$ genannt.

Die Abb. VII zeigt die Elution der drei Phosphatasen, wobei die TNT-Phosphatase bei niedrigerer Salzkonzentration eluiert wurde, als die TNI-bzw. Phosphorylase-Phosphatase. Daher wurde die TNT-Phosphatase teilweise abgetrennt.

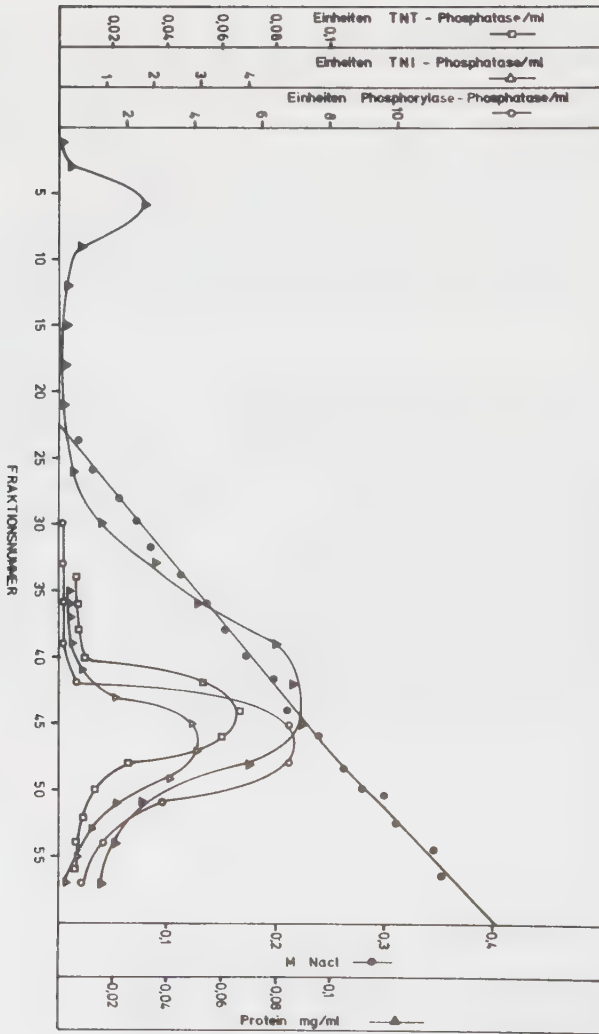


Abb. VII: Elutionsprofil der Protein-Phosphatasen bei
Chromatographie an Histon Sepharose

Die Proteinkonzentration sowie die Aktivität der Protein-Phosphatasen wurde, wie unter 2.2.2./2.2.6./2.2.7. angegeben, bestimmt. Die NaCl Konzentration wurde durch Messung der Leitfähigkeit (wie unter 2.2.15. dargestellt) ermittelt.

Sonstige Bedingungen wurden im Text beschrieben.

3.6.4. Gelfiltration über Sepharose 6-B in Anwesenheit von
0.5 M KCl

Die $S_{II}^{H_C}$ Fraktion wurde mit 0.5 M KCl versetzt, 20 Minuten bei 0° C inkubiert und durch eine Sepharose 6-B Säule (2.8 x 100 cm) äquibriert mit 50 mM Tris/HCl, 1 mM DTE, 0.05 mM PMSF, 0.1 mM Mn^{2+} und 0.5 M KCl pH 7.5 bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 90 ml/h filtriert.

Das Filtrat wurde in 10 ml Fraktionen gesammelt.

Die Aktivität der Protein-Phosphatasen wurde bei so hoher Verdünnung getestet, daß das Salz nicht mehr den Test beeinflussen konnte. Die Fraktionen 78 - 85 sowie 86 - 96 wurden vereinigt und mit Fraktion I bzw. II bezeichnet (siehe Abb. VIII). Die beiden Fraktionen wurden jeweils in einer Amicon Ultrafiltrationszelle über eine PM-10 Diaflow Membran im Verhältnis 1 : 20 ankonzentriert und bei -30° C aufbewahrt.

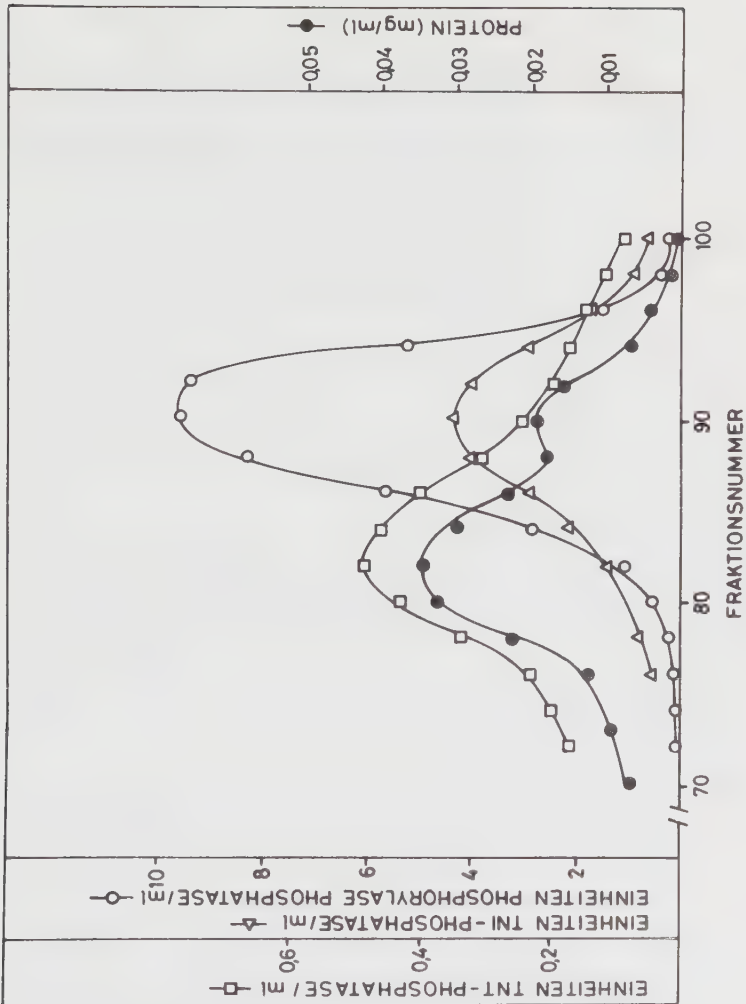


Abb. VIII: Elutionsprofil der Protein-Phosphatasen bei der Gelfiltration in Gegenwart von 0.5 M KCl

Die Aktivität der Protein-Phosphatasen wurde, wie unter 2.2.6./2.2.7. beschrieben, getestet.

Die Protein Konzentration wurde, wie unter 2.2.2. angegeben, gemessen.

Die Puffer und sonstige Bedingungen wurden im Text beschrieben.

3.7. Vergleich der Reinigungsschritte der drei Protein-Phosphatasen

Die Reinigungsschritte der drei Protein-Phosphatasen sind in Tab. 8 zusammengefaßt.

Das Aktivitätsverhältnis wurde durch Division der Aktivität der Phosphorylase a durch die der TNI-bzw. TNT-Phosphatase errechnet. Die Aktivitätsverhältnisse der Phosphorylase a/TNT bzw. TNI im Rohextrakt betragen 5.0 bzw. 3.0 (siehe Tab. 8).

Bei der Chromatographie des Rohextraktes an hydrophobem Gel wurden 35 % der gesamten Aktivitäten der Phosphorylase-, 2.2 % der TNT- und 0.69 % der TNI-Phosphatase im Durchlauf gefunden. Durch den ersten Reinigungsschritt hatte sich die Phosphorylase-Phosphatase 25-, TNT-Phosphatase 31- und TNI-Phosphatase 26-fach angereichert; das Aktivitätsverhältnis von a/TNT bzw. a/TNI, hatte sich geringfügig geändert. Die Ausbeute der Protein Phosphatasen betrug 64 bis 80 %.

Die weitere Reinigung der Protein-Phosphatasen durch Gelfiltration über Sepharose 6-B brachte eine 2 - 3-fache Anreicherung. Durch den zweiten Reinigungsschritt wurde die Aktivität aller drei Protein-Phosphatasen etwa im gleichen Verhältnis angereichert.

Die Aktivitätsausbeuten bei diesem Schritt lagen bei 50 - 70 %.

Die weitere Reinigung der Protein-Phosphatasen erfolgte durch Chromatographie an Histon Sepharose.

S c h r i t t	Vol.	Protein	Phosphorylase-Phosphatase				TNT-Phosphatase				TNI-Phosphatase				Aktivitäts- verhältnis von
			spezi- fische Akti- vität	Anrei- cherung	Ausbeu- te	%	spezi- fische Akti- vität	Anrei- cherung	Ausbeu- te	%	spezi- fische Akti- vität	Anrei- cherung	Ausbeu- te	%	
Rohextrakt	ml	mg	E/mg	-mal		%	E/mg	-mal		%	E/mg	-mal		%	a/TNT a/TNI Phosphatasen
	1600	14080	0.40	1.0	100		0.08	1.0	100		0.135	1	100		5.0 3.0
Hydrophobe Chromatographie	Durchlauf	4400	13200	0.15	-	35	0.002	-	2.2		0.001	-	0.69		- -
	Eluat	72	368	9.90	25	64	2.47	31	80		3.57	26	69		4.0 2.8
Sephacrose 6-B		460	92	27.5	69	45	5.8	72	47		7.2	53	35		4.7 4.0
Histon-Sephacrose		17.0	27	47.1	118	22	1.56	20	3.7		9.0	67	13.0		30 5.2
Sephacrose 6-B in Anwesenheit von 0.5 M KCl	Fraktion II	2.5	0.75	185	462	2.5	0.6	8.0	0.04		20.5	152	0.80		308 9.0
	Fraktion I	8.0	6.60	11.3	28	1.31	3.6	45	1.0		0.91	6.7	0.31		3.1 12.4

Tab. 8: Reinigung der Phosphorylase α -, TNT- und TNI-Phosphatase aus Kaninchen Skelettmuskel

Die Phosphorylase-Phosphatase hatte sich in diesem Schritt ca. 2-fach angereichert. Dagegen wurde eine 3-fache Abnahme der spezifischen Aktivität von TNT-Phosphatase verzeichnet, was darauf zurückzuführen ist, daß die letztere teilweise abgetrennt wurde (siehe unter 3.6.3.). Die TNI-Phosphatase wurde geringfügiger angereichert. Das Aktivitätsverhältnis der $\underline{a}$ /TNT- Phosphatase wurde 6-fach und das der $\underline{a}$ /TNI- Phosphatase 2-fach erhöht. Die Zunahme des Aktivitätsverhältnisses ist auf die partielle Trennung der TNT-Phosphatase von Phosphorylase-Phosphatase zurückzuführen (siehe Abb. VII).

Als letzter Reinigungsschritt wurde das Eluat von Histon-Sephrose ($S_{II}H_C$), wie unter 3.6.4. beschrieben, in Gegenwart von 0.5 M KCl über Sepharose 6-B filtriert. Dabei wurde die TNT-Phosphatase von Phosphorylase- und TNI-Phosphatase weitgehend abgetrennt. Die Phosphorylase-Phosphatase (Fraktion II) wurde insgesamt 460-, die TNI-Phosphatase 150- und die TNT-Phosphatase 8-fach angereichert. Durch Trennung der TNT- und TNI-Phosphatase von Phosphorylase-Phosphatase hatte sich das Aktivitätsverhältnis von $\underline{a}$ /TNT-Phosphatase insgesamt 60-fach, das von $\underline{a}$ /TNI-Phosphatase nur 3-fach erhöht.

In der Fraktion I dagegen wurde die TNT-45-, Phosphorylase-28- und TNI-Phosphatase 6,7-fach angereichert. Das Aktivitätsverhältnis von $\underline{a}$ /TNT-Phosphatase nahm um den Faktor 2 ab, während das Aktivitätsverhältnis von $\underline{a}$ /TNI-Phosphatase 4-fach zunahm.

3.8. Kinetische Messungen der Dephosphorylierung verschiedener Substrate, Ermittlung der K_m -Werte der Protein-Phosphatasen

Zur Charakterisierung der angereicherten Protein-Phosphatasen (S_{II} -Fraktion) wurde die Reaktionsgeschwindigkeit der Enzyme mit steigender Substratskonzentration von 0.05 - 1.60 mg/ml Ansatz bei einer Enzymkonzentration von 0.06 mg/ml für alle drei genannten Substrate bestimmt. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei 30° C.

Die Aktivität der Protein-Phosphatasen wurde, wie unter 2.2.6./2.2.7. angegeben, getestet. Die Parameter K_m und V_{max} der Michaelis-Menten-Funktion wurden mit Hilfe des Programms "Hyper", wie unter 2.2.16. angegeben, errechnet und wurden in Tab. 9 zusammengefaßt.

Die Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit der TNT- und TNI-Phosphatase ist identisch, während der K_m -Wert der Phosphorylase-Phosphatase 2-fach niedriger ist als TNI- und TNT-Phosphatase.

Die maximale Geschwindigkeit der TNT-Phosphatase ist 2- bzw. 4-fach niedriger als Phosphorylase- bzw. TNI-Phosphatase.

Enzym	Substrate	K_m mg/ml	V_{max} nmol P_a /min x mg
Phosphorylase- Phosphatase	Phosphorylase <u>a</u>	1.32 ± 0.09	53 ± 1.99
TNT-Phosphatase	TNT-P	3.10 ± 0.40	22 ± 2.66
TNI-Phosphatase	TNI-P	3.64 ± 1.0	90.28 ± 19.43

Tab. 9: Michaeliskonstanten und maximale Geschwindigkeiten der Phosphorylase-, TNT- und TNI-Phosphatase

3.9. Verdünnungseffekte bei der Dephosphorylierung der Phosphorylase a durch die angereicherte Phosphatase

FISCHER und HURD (1976) beschrieben, daß zwischen der Enzymaktivität und Proteinkonzentration der Phosphorylase-Phosphatase keine Proportionalität besteht. In einer Konzentrationsreihe steigender Verdünnung wurde zunächst ein Anstieg der Aktivität, bei weiterer Verdünnung wieder eine Abnahme der spezifischen Aktivität festgestellt. Durch Zugabe von 0.1 mM Mn^{2+} zum Reaktionsansatz konnte der Abfall der Aktivität aufgehoben werden (DJOVKAR 1974).

3.9.1. Einfluß von Metallionen auf die Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase

Phosphorylase-Phosphatase konnte durch Zusatz von 0.1 mM Co^{2+} bzw. Mn^{2+} -Ionen um das ca. 5- bzw. ca. 2-fache in der S_{II} -Fraktion aktiviert werden.

Kein Effekt wurde durch Zugabe von Ca^{2+} , Zn^{2+} , K^+ oder Na^+ -Ionen festgestellt, während eine zweifache Hemmung durch Mg^{2+} beobachtet wurde (siehe Tab. 10).

Die Mn^{2+} -Konzentration, die zu halbmaximaler Aktivierung (K_a) der Phosphorylase-Phosphatase führte, betrug 2×10^{-5} M (siehe Abb. IX).

Metall-Ionen 0.1 mM	Spez. Aktivität E/mg	Rel. Aktivität %
-	27.0	100
Na ⁺	26.4	98
K ⁺	27.0	100
Ca ²⁺	25.6	97
Zn ²⁺	26.4	98
Mg ²⁺	13.5	50
Mn ²⁺	81.2	300
Co ²⁺	136.0	500

Tab. 10: Einfluß von Metallionen auf die Aktivität
der Phosphorylase-Phosphatase

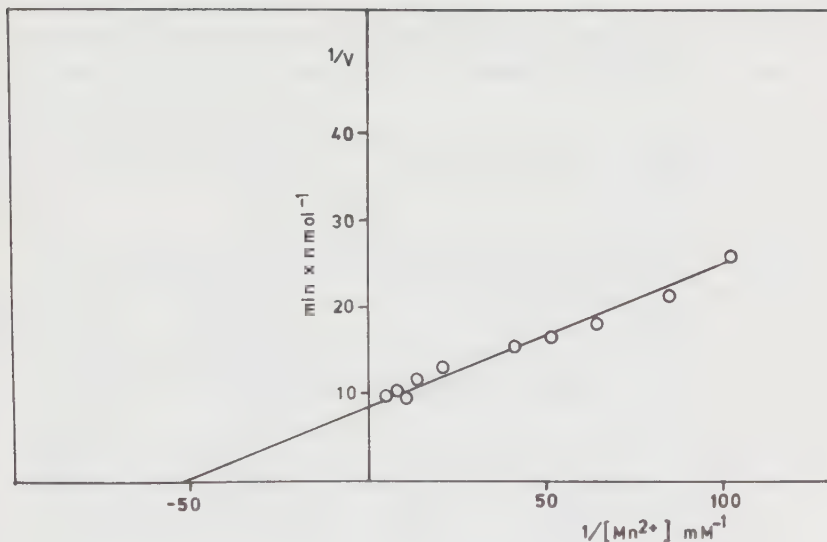


Abb. IX: Bestimmung des K_a -Wertes der Phosphorylase-Phosphatase für Mn^{2+} -Ionen

Die Isolierung der Phosphorylase-Phosphatase wurde in Anwesenheit von 2 mM EDTA durchgeführt, um Metallionen zu komplexieren. Die Phosphorylase-Phosphatase (S_{II}-Fraktion) wurde gegen 50 mM Tris, 1 mM DTE (pH 7.5) für 5 Stunden dialysiert. Die Aktivität des Enzyms wurde bei 1 : 50 Verdünnung mit den letztgenannten Puffern, wie unter 2.2.6. angegeben, getestet. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde mit steigender Effekorkonzentration von 0.01 - 0.2 mM Mn^{2+} gemessen.

Sonstige Bedingungen wurden im Text beschrieben.

Für das Co^{2+} -Ion wurde ebenfalls ein K_a -Wert von 1×10^{-5} M gefunden.

Der Einfluß der Mn^{2+} -Ionen auf die Aktivität der TNT- und TNI-Phosphatasen wurde zum Vergleich untersucht. Es zeigt sich, daß die TNT-Phosphatase ca. 3-fach aktiviert wurde, während die TNI-Phosphatase unbeeinflußt blieb (siehe Tab. 11).

Der K_a -Wert für Mn^{2+} -Ionen bei TNT-Phosphatasen betrug 2×10^{-5} M (siehe Abb. X).

Enzym Mn^{2+} mM	Phosphorylase- Phosphatase		TNT-Phosphatase		TNI-Phosphatase	
	Spez. Akt.	Akt. Änd.	Spez. Akt.	Akt. Änd.	Spez. Akt.	Akt. Änd.
	E/mg	%	E/mg	%	E/mg	%
0	13.0	100	3.30	100	6.4	100
0.1	30.0	230	9.40	285	6.1	95

Tab. 11: Einfluß der Mn^{2+} -Ionen auf die Aktivität der Protein-Phosphatasen

Die Protein-Phosphatasen (S_{II} -Fraktion) wurden wie unter 3.6.2. beschrieben, jedoch in Gegenwart von 2 mM EDTA hergestellt. Ihre Aktivitäten wurden in Anwesenheit von 0.1 mM Mn^{2+} wie unter 2.2.6./2.2.7. beschrieben, getestet.

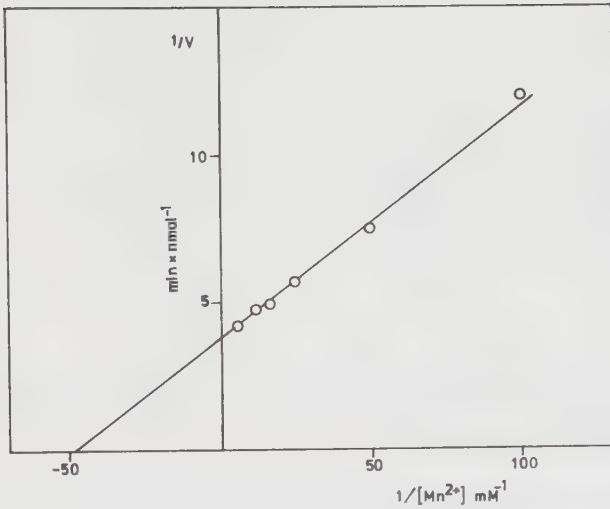


Abb. X: Bestimmung des K_d -Wertes der TNT-Phosphatase für Mn^{2+} -Ionen

Die TNT-Phosphatase (S_{II}-Fraktion) wurde wie unter 3.6.2. beschrieben, aber in Gegenwart von 2 mM EDTA isoliert und anschließend gegen 50 mM Tris, 1 mM DTE (pH 7.5) für 5 Stunden dialysiert. Die TNT-Phosphatase Aktivität wurde wie unter 2.2.7. angegeben, getestet. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde mit steigender Effek-
torkonzentration von 0.01 - 0.2 mM²⁺ bestimmt.

3.9.2. Untersuchung der Mn^{2+} -bindenden Proteine im Rohextrakt

Der Rohextrakt wurde, wie unter 3.2. beschrieben, hergestellt und über eine Sepharose 6-B filtriert.

Die Mn^{2+} -Konzentration in den Fraktionen wurde mit Hilfe eines Atomabsorptionsspektrometers bestimmt (siehe 2.2.17.).

Die Abb. XI zeigt das Mn^{2+} Elutionsprofil, die Phosphorylase-Phosphatase-Aktivität und die Proteinkonzentration.

Der Aktivitätsgipfel des Enzyms stimmt nicht mit dem des Mn^{2+} -bindenden Proteins überein.

Offensichtlich existieren im Rohextrakt also noch andere Mn^{2+} -bindende Proteine.

3.9.3. Mn^{2+} -bindende Proteine in den angereicherten Protein-Phosphatasen (S_{II} -Fraktionen)

Die Protein-Phosphatasen wurden über eine Sepharose 6-B Säule filtriert und in den Fraktionen die Mn^{2+} -Konzentration, wie unter 3.9.2. beschrieben, bestimmt. Da alle drei Phosphatasen das gleiche Elutionsvolumen auf Sepharose besitzen, wurde nur die Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase getestet.

Der Aktivitätsgipfel des Enzyms stimmt mit dem Mn^{2+} -Elutionsprofil überein (s. Abb. XII). Die Korrelation sowie die Mn^{2+} -Aktivierbarkeit der Phosphorylase-Phosphatase veranlaßt zur Annahme, daß die Phosphorylase-Phosphatase ein Mn^{2+} -Metallprotein sein könnte.

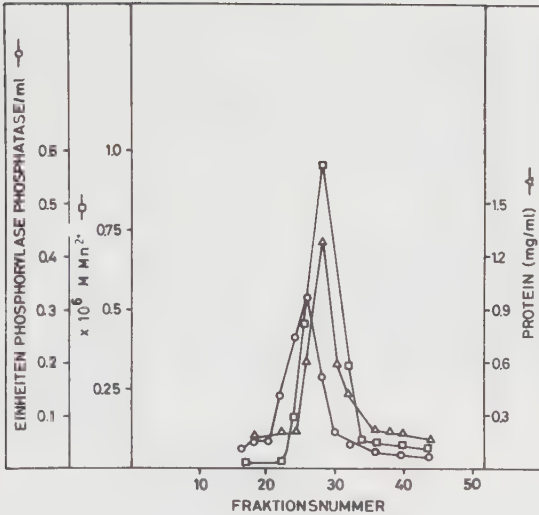


Abb. XI : Elutionsprofil der Mn²⁺-Bindungsproteine aus Rohextrakt bei Gelfiltration über Sepharose 6-B

40 ml Rohextrakt wurden, wie im Text beschrieben, hergestellt und auf eine Sepharose 6-B Säule (3.0 x 38 cm), äquilibriert mit 50 mM Tris, 1 mM DTE, 1 mM EDTA (pH 7.5), aufgetragen. Die Elution erfolgte mit dem oben genannten Puffer bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 30 ml/h.

Das Eluat wurde in 1.2 ml Fraktionen gesammelt. Die Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase sowie Protein Konzentrationen wurden, wie unter 2.2.6./2.2.2. angegeben, durchgeführt. Die Mn²⁺ Bestimmung erfolgte durch Atomabsorptionsspektrometrie.

Weitere Bedingungen wurden im Text beschrieben.

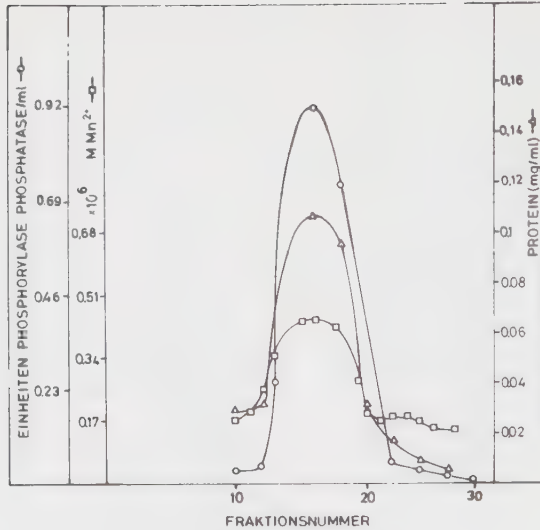


Abb. XII: Elutionsprofil der Mn²⁺-Bindungsproteine und Phosphorylase-Phosphatase (S_{II}-Faktion) bei Gelfiltration über Sepharose 6-B

0.9 ml S_{II}-Fraktion (2.2 mg/ml) wurde über eine Sepharose 6-B Säule (0.9 x 60 cm), äquilibriert mit 50 mM Tris, 1 mM DTE, 1 mM EDTA (pH 7.5) filtriert, das Eluat wurde in 1.5 ml Fraktionen gesammelt.

Die Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase, Protein Konzentration und Mn²⁺-Bestimmungen wurde, wie unter 2.2.6./2.2.2./2.2.17. beschrieben, durchgeführt.

3.9.4. Einfluß von 0.1 mM Mn^{2+} auf die Aktivität der weiter angereicherten Protein-Phosphatasen

Zum Vergleich mit den oben beschriebenen Ergebnissen wurde die Mn^{2+} -Aktivierbarkeit der über Histon-Sepharose und Gel-filtration weiter angereicherten Protein-Phosphatasen untersucht. Die Aktivität der Protein-Phosphatasen wurde in Ab- und Anwesenheit von 0.1 mM Mn^{2+} , wie unter 2.2.6./2.2.7. beschrieben, getestet.

Durch die weitere Anreicherung ist die Aktivierbarkeit der Phosphorylase-Phosphatase weitgehend verloren gegangen. Im Gegensatz dazu konnte auf dieser Reinigungsstufe jedoch eine 10-fache Aktivierung der TNT-Phosphatase und eine 70 %ige Hemmung der TNI-Phosphatase durch Mn^{2+} beobachtet werden (siehe Tab. 12).

Enzym Mn^{2+} mM	Phosphorylase-Phosphatase		TNT-Phosphatase		TNI-Phosphatase	
	Spez. Akt.	Akt.	Spez. Akt.	Akt.	Spez. Akt.	Akt.
	E/mg	%	E/mg	%	E/mg	%
0	80	100	0.5	100	20	100
0.1	90	112	5.34	1068	6.6	33

Tab. 12: Einfluß von 0.1 mM Mn^{2+} auf die Aktivität der Protein-Phosphatasen

Die Protein-Phosphatasen wurden, wie unter 3.6. beschrieben, jedoch in Gegenwart von 2 mM EDTA isoliert.

In Anwesenheit von 0.1 mM Mn^{2+} im Inkubationsansatz wurde die Aktivität der Protein-Phosphatasen, wie unter 2.2.6./2.2.7. aufgeführt, bestimmt.

Sonstige Angaben wurden im Text beschrieben.

3.10. Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes der Protein-Phosphatasen durch Gelfiltration

Die Messung des apparenten Molekulargewichtes der Protein-Phosphatasen erfolgte in einer mit 50 mM Tris, 1 mM DTE, 0.1 mM Mn^{2+} (pH 7.5) äquilibrierten Sepharose 6-B Säule (2.5 x 83 cm) in Ab- und Anwesenheit von 0.5 M KCl. Als Eichproteine wurden Ferritin mit einem Molekulargewicht von 450.000, Urease 473.000, Katalase 240.000, Phosphorylase 200.000, Aldolase 158.000 und Hämoglobin 64.500 gewählt. Die Abb. XIII zeigt die Eichkurve für die verwendete Säule. Anhand der Evolutionsvolumina der Protein-Phosphatasen wurden ihre Molekulargewichte ermittelt, und wie folgt zusammengefaßt:

Enzym	[KCl]	Elutions- volumen	Molekular- gewicht
	mM	(ml)	
S _{II} -Fraktion	0	266	250.000
Fraktion I	500	320	105.000
Fraktion II	500	343	65.000
Fraktion I	0	298	150.000
Fraktion II	0	310	120.000

Für die Protein-Phosphatasen in der S_{II}-Fraktion (siehe 3.6.2.) wurde ein apparentes Molekulargewicht von 250.000 gemessen. Das Molekulargewicht der TNT-Phosphatase in Fraktion I (siehe 3.6.4.) in Anwesenheit von 0.5 M KCl betrug 150.000. Phosphorylase- und TNI-Phosphatase besaßen in Fraktion II (siehe 3.6.4.) ein Molekulargewicht von 65.000. Die Fraktionen I und II wurden gegen 50 mM Tris, 1 mM DTE

und 0.1 mM Mn^{2+} dialysiert und das Molekulargewicht wie oben bestimmt.

Unter diesen Bedingungen wurde ein Molekulargewicht von 150.000 für TNT-Phosphatase und ein Molekulargewicht von 120.000 für TNI- und Phosphorylase-Phosphatase ermittelt.

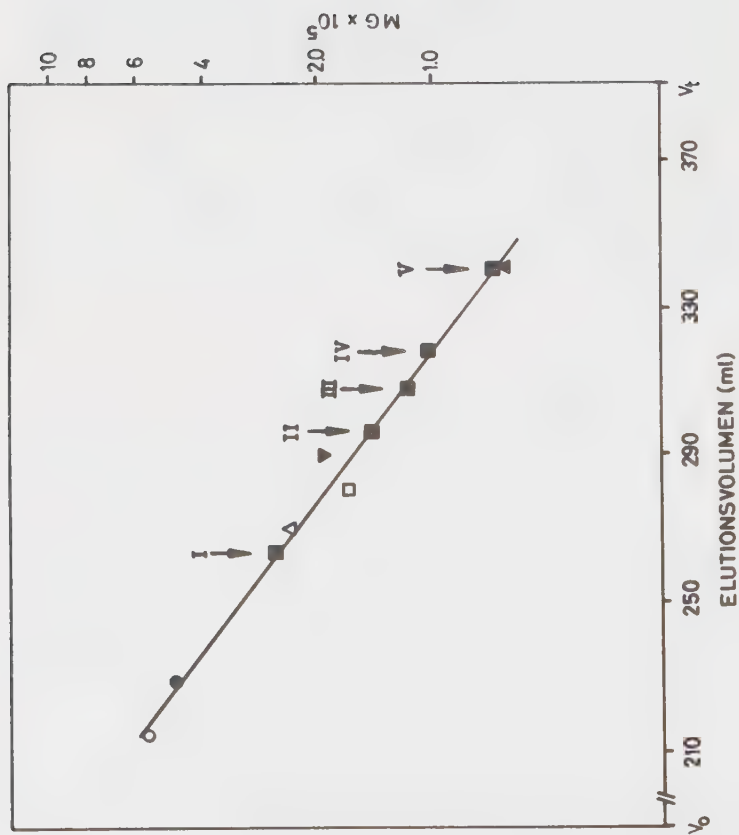


Abb. XIII: Eichkurve zur Molekulargewichtsbestimmung durch Gel-filtration an Sepharose 6-B

1.0 ml Protein-Phosphatasen bzw. Eichproteine wurden über eine Sepharose 6-B Säule äquilibriert mit 50 mM Tris, 1 mM DTE, 0.1 mM Mn^{2+} filtriert und das Filtrat in 5.4 ml Fraktionen gesammelt. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 30 ml/h. Die Bestimmung der Elutionsvolumina bei den einzelnen Eichproteinen wurde durch Proteinbestimmung in den Fraktionen ermittelt. Die Aktivität der Protein-Phosphatasen wurden, wie unter 2.2.6./2.2.7. beschrieben, getestet. Die Bestimmung des Durchbruchvolumens V_0 erfolgt mit Dextranblau 2.000, die des Totalvolumens V_t mit Bromphenolblau.

Sonstige Angaben wurden unter 2.2.9. beschrieben.

Ferritin: -O-
 Urease: -●-
 Katalase: -△-
 Aldolase: -□-
 Phosphorylase: -▼-
 Hämoglobin: -▲-

	[KCl] M	
Phosphorylase-, TNI- und TNT-Phosphatase:	0	I
TNT-Phosphatase:	0	II
TNI- und Phosphorylase-Phosphatase:	0	III
TNT-Phosphatase:	0.5	IV
TNI- und Phosphorylase-Phosphatase:	0.5	V

3.11. Elektrophoretische Auftrennung der Protein-Phosphatasen

3.11.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche 7.5 %ige Polyacrylamid-Elektrophorese nach HEDRICK und SMITH (1968) der Fraktion II ergab multiple Protein-Banden.

Die Protein-Banden mit einem R_f -Wert von 0.15, 0.26, 0.48, 0.73 und 0.93 können als wesentliche Komponenten der Protein-Phosphatasen identifiziert werden (siehe Abb. XIV). Zur Bestimmung, welche der Protein-Banden welcher Phosphatase zugeordnet ist, wurde ein Gel, wie unter 2.2.14. beschrieben, ge- und entfärbt, und ein weiteres nicht behandeltes Gel wurde in 2 mm dicke Scheiben geschnitten und homogenisiert. Nach der Homogenisierung in 50 mM Tris, 1 mM DTE, 0.1 mM Mn^{2+} (pH 7.5) wurde die Aktivität der Protein-Phosphatasen in beschriebener Weise (siehe 2.2.6./2.2.7.) bestimmt.

In Abb. XV wurde die Aktivität der Protein-Phosphatase in Gelscheiben dargestellt. Aufgrund des R_f -Wertes der Protein-Banden wurde es möglich, die entsprechenden Aktivitäten den Protein-Phosphatasen zuzuordnen. Die Protein-Bande von R_f 0.15 und 0.26 besaßen Phosphorylase-, TNT- und TNI-Phosphatase-Aktivität. Das Protein mit einem R_f -Wert von 0.48 wies TNT- und TNI-Phosphatase-Aktivität auf, das mit einem R_f Wert von 0.73 wurde als TNT-Phosphatase identifiziert, und das mit einem R_f Wert von 0.93 als TNI-Phosphatase.

Die Protein-Phosphatase-Aktivitäten können zu entsprechenden Protein-Banden zugeordnet werden. Sie machen ca. 70 % des gesamten Proteins aus.



Abb. XIV: Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Protein-Phosphatasen (Fraktion II)

100 µg Protein-Phosphatasen wurden in 50 mM Tris, 20 mM ME, 0.02 % Bromphenolblau und 20 % Sucrose (pH 7.9) aufgenommen und auf ein 75 % Polyacrylamid-gel aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde in 0.034 M Asparagin/Tris, 3 mM Cystein (pH 7.3) bei 4° C und einer Stromstärke von 3 mA pro Gel für 4 Stunden durchgeführt. Die Gele wurden ge- und entfärbt, und wie unter 2.2.13./2.2.14. behandelt.

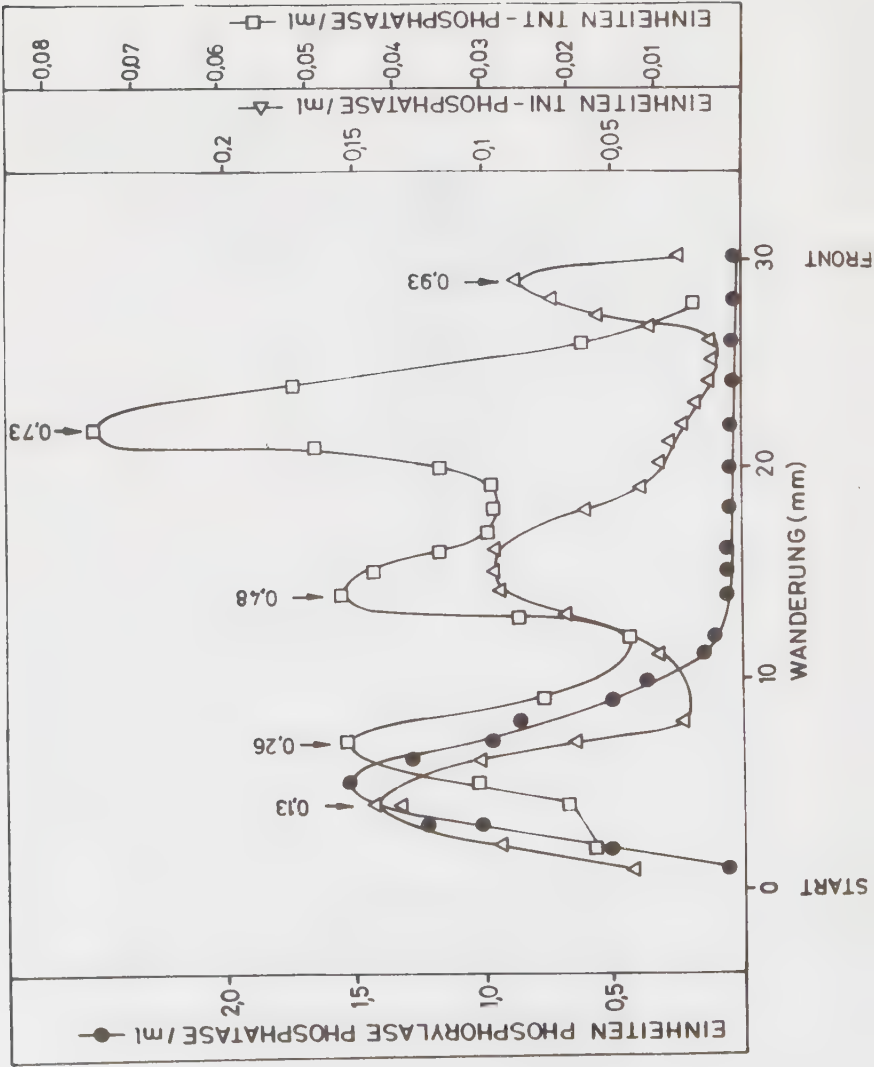


Abb. XV: Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese
der Protein-Phosphatasen (Fraktion II)

Die Elektrophorese wurde, wie unter Abb. XIV beschrieben, durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel in 2 mm dicke Scheibchen geschnitten. Die Scheibchen wurden in 50 mM Tris, 1 mM DTE, 0.1 mM Mn^{2+} (pH 7.5) homogenisiert.

Die Aktivität der Protein-Phosphatasen im Homogenat wurde, wie unter 2.2.6./2.2.7. beschrieben, gemessen.

Sonstige Bedingungen wurden unter 2.2.13./2.2.14. beschrieben.

3.11.2. Polyacrylamidgel-Elektrophorese in Gegenwart von SDS

Folgende Systeme wurden verwendet:

a) nach WEBER und OSBORN (1969)

Die Fraktion II (siehe 3.6.4.) der Protein-Phosphatasen wurde, wie unter 2.2.11. beschrieben, durch SDS denaturiert, und die Polypeptide auf 7.5 % Polyacrylamid aufgetrennt. Dieses Material enthielt im wesentlichen zwei Polypeptidketten mit Molekulargewichten von 60.000 und 42.000 (siehe Abb. XVI).

b) nach NEVILLE (1971)

Die Protein-Bande mit einem R_f von 0.15 in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach HEDRICK und SMITH (siehe 3.9.1.) enthielt alle drei Aktivitäten der Protein-Phosphatasen.

Es wurde untersucht, ob diese Bande das gleiche Komponenten-Muster aufweist, wie die unter a) beschriebene Komponente des SDS-Polyacrylamidgels.

Die Protein-Bande wurde gegen H_2O dest. über Nacht dialysiert und anschließend in SDS homogenisiert (siehe 2.2.12.) und das Homogenat auf das nach NEVILLE hergestellte Gel aufgeschichtet. Wie Abb. XVII zeigt, enthält das Material eine Hauptkomponente mit einem Molekulargewicht von 60.000 und zwei weitere Nebekomponenten mit Molekulargewichten von 42.000 und 36.000.

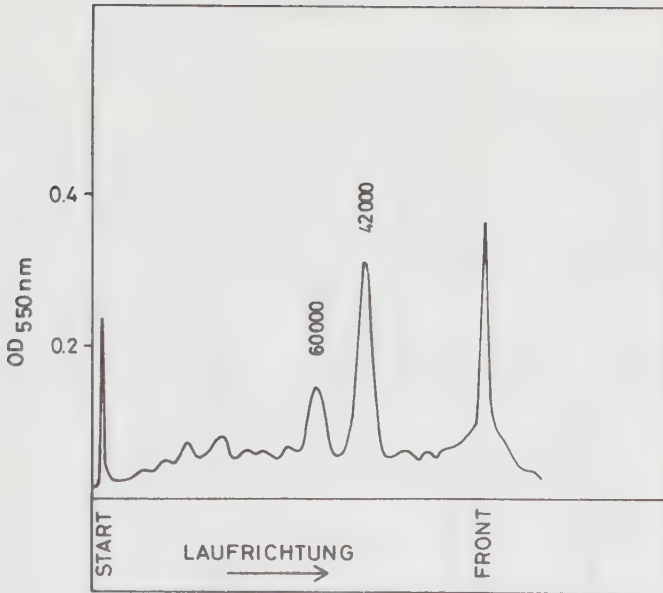


Abb. XVI: Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach WEBER und OSBORN (1969)

20 µg angereicherte Protein-Phosphatase (Fraktion II) wurde im SDS Puffer (siehe unter 2.2.11.) für 5 Minuten bei 100° C denaturiert. Die Laufzeit betrug 4 Stunden bei einer Stromstärke von 8 mA/Gel.

Weitere Bedingungen wurden unter 2.2.11. beschrieben.

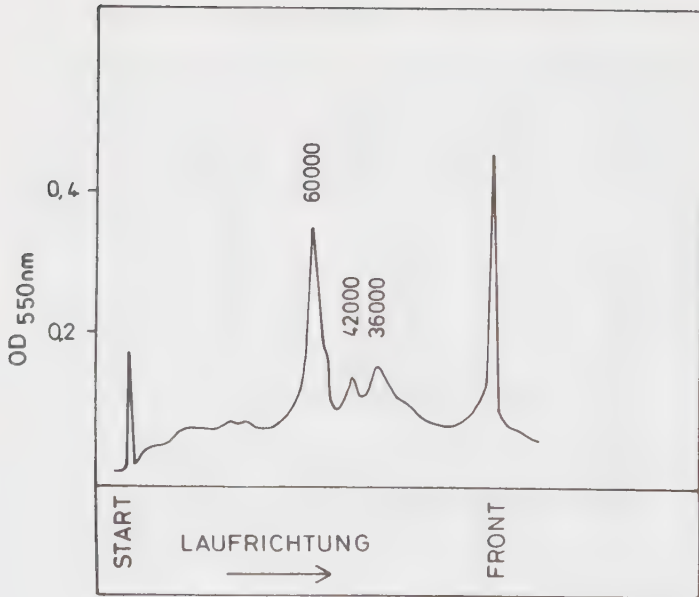


Abb. XVII: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Protein-Phosphatase in Gelscheibchen nach NEVILLE (1971)

Die unter 3.11.1. beschriebenen homogenisierten Gelscheibchen wurden gegen H_2O dialysiert. Das Dialysat wurde in 0.108 M Tris/ H_2SO_4 , 1 % SDS, 3 mM DTE, 10 % Glycerin, 0.005 % Bromphenolblau (pH 6.1) aufgenommen und bei $100^\circ C$ für 5 Minuten erhitzt. Die Elektrophorese wurde im oben genannten Puffer durchgeführt.

Weitere Angaben und Bedingungen wurden unter 2.2.12. beschrieben.

3.12. Vergleich der Eigenschaften der Protein-Phosphatasen
in Fraktion II

3.12.1. Proteolytische Verdauung der Protein-Phosphatasen
durch Trypsin

Die Protein-Phosphatasen wurden bei einem Gewichtsverhältnis von 6 : 1 mit Trypsin für 20 Minuten bei 30° C verdaut. In verschiedenen Zeitabständen wurde ein Aliquot entnommen und die Reaktion durch Zugabe einer 10-fachen Gewichtsmenge Trypsininhibitor (Sojabohnen) gestoppt.

Die Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase blieb während der Inkubation von 20 Minuten bei 30° C unverändert.

TNT-Phosphatase verlor in 4 Minuten, TNI-Phosphatase in 16 Minuten 90 % ihrer Aktivität. Die Abb. XVIII zeigt das unterschiedliche Verhalten der drei Protein-Phosphatasen bei der Einwirkung von Trypsin.

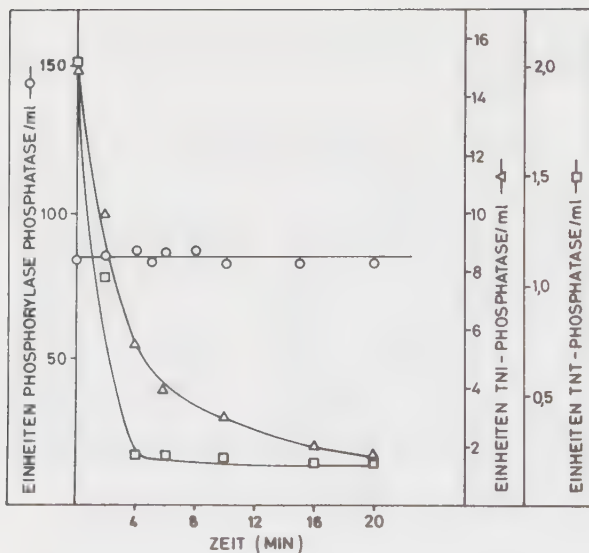


Abb. XVIII: Proteolytische Verdauung der Protein-Phosphatasen durch Trypsin

Der Testansatz von 1.0 ml enthält 0.18 mg/ml Protein-Phosphatasen und 0.03 mg/ml Trypsin. Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten bei 30° C. Die Reaktion wurde in verschiedenen Zeitabständen durch Zugabe einer 10-fachen Gewichtsmenge Trypsininhibitor gestoppt.

Die Protein-Phosphatasen wurden, wie unter 2.2.6./2.2.7. beschrieben, gemessen.

Sonstige Bedingungen wurden im Text beschrieben.

3.12.2. Einfluß von 8 M Harnstoff auf die Aktivität der Protein-Phosphatasen

Die Protein-Phosphatasen wurden in Gegenwart von 8 M Harnstoff 10 Minuten bei 30° C inkubiert und die Aktivität der Protein-Phosphatasen nach 100-facher Verdünnung wie unter 2.2.6./2.2.7. beschrieben, gemessen. Die Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase wurde während der Inkubationszeit von 10 Minuten in Anwesenheit von 8 M Harnstoff nicht beeinflusst, während die TNT-Phosphatase innerhalb von 2 Minuten und die TNI-Phosphatase von 4 Minuten 90 % ihrer Aktivität verloren. In der Abb. XIX wurde die Aktivitätsveränderung der Protein-Phosphatasen während der Inkubationszeit aufgetragen.

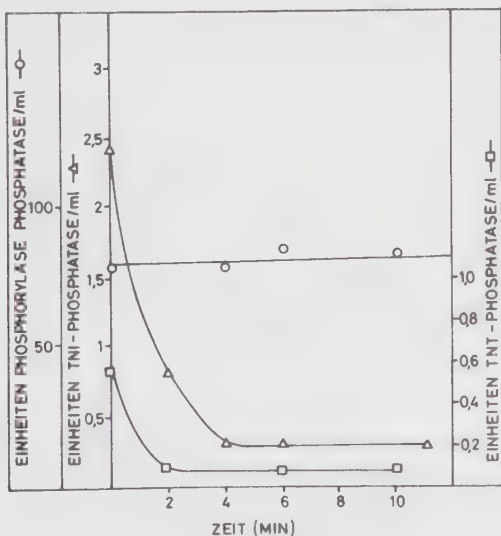


Abb. XIX: Einwirkung von 8 M Harnstoff auf Protein-Phosphatasen

1.8 mg/ml Protein-Phosphatasen wurden mit 8 M Harnstoff für 10 Minuten bei 30° C inkubiert. Die Reaktion wurde bei 0° C gestoppt und gegen 50 mM Tris, 1 mM DTE, 0.1 mM Mn^{2+} (pH 7.5) für 5 Stunden dialysiert.

Sonstige Bedingungen wurden im Text beschrieben.

3.12.3. Wärmostabilität der Protein-Phosphatasen

Während einer Inkubation bei 50° C verlor die Phosphorylase-Phosphatase 50 % ihrer Aktivität innerhalb von 30 Minuten, während die TNI-Phosphatase nach 14 und die TNT-Phosphatase bereits nach 5 Minuten nur noch die Hälfte ihrer Anfangsaktivität besaßen (siehe Abb. XX).

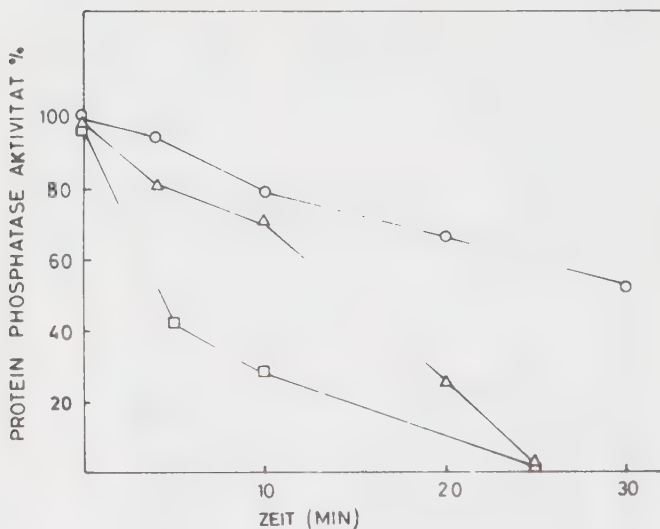


Abb. XX: Wärmostabilität der Protein-Phosphatasen

1.8 mg/ml Protein-Phosphatasen wurden 30 Minuten bei 50° C inkubiert. In verschiedenen Zeitabständen wurde ein Aliquot entnommen, auf Eis abgekühlt und die Aktivität der Enzyme wie unter 2.2.6./2.2.7. beschrieben, getestet.

Sonstige Bedingungen wurden im Text beschrieben.

Phosphorylase-Phosphatase O-O

TNI-Phosphatase Δ - Δ

TNT-Phosphatase $\square$ - $\square$

3.12.4. Einfluß von KCl auf die Aktivität der Protein-Phosphatasen

In Anwesenheit von 0.12 M KCl wurden die TNT- und TNI-Phosphatasen zu 50 % gehemmt. Die gleiche Hemmung konnte bei der Phosphorylase-Phosphatase mit 0.25 M KCl erreicht werden. Die Aktivitätsveränderung bei steigender KCl-Konzentration kann aus der Abb. XXI entnommen werden.

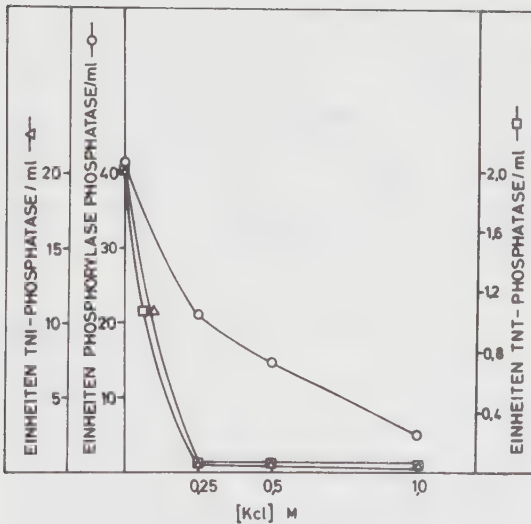


Abb. XXI: Einfluß von KCl auf die Aktivität der Protein-Phosphatasen

1.8 mg/ml Protein-Phosphatasen wurden gegen (0.1 - 1.0 M KCl in 50 mM Tris, 1 mM DTE, pH 7.5) über Nacht dialysiert und die Aktivität der Protein-Phosphatasen wie unter 2.2.6./2.2.7. beschrieben, getestet.

3.12.5. Einfluß von TNI auf die Phosphorylase-Phosphatase-Aktivität

Die ^{32}P -markierte Phosphorylase a wurde mit nicht radioaktivem phosphoryliertem TNI in verschiedenen Volumenverhältnissen zusammengemischt und als Substrat der Phosphorylase-Phosphatase angeboten. Als Kontrollwert wurde die ^{32}P -markierte Phosphorylase a verwendet.

Die Phosphorylase-Phosphatase-Aktivität wurde wie unter 2.2.6. angegeben, bestimmt. Die Konzentration der Substrate sowie die Aktivität der Phosphorylase-Phosphate in Ab- und Anwesenheit von TNI wurden in Tab. 13 dargestellt.

Der Einfluß von TNT auf die Dephosphorylierung der Phosphorylase wurde nicht gemessen, da zur Differenzierung der TNT-Phosphatase von Phosphorylase-Phosphatase eindeutige Hinweise gezeigt wurden. Die Tab. 13 zeigt, daß die Anwesenheit von TNI keinen wesentlichen Einfluß auf die Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase nahm.

S u b s t r a t	Phosphorylase-
	Phosphatase-Aktivität E/ml
0.63 mg/ml Phosphorylase <u>a</u>	0.15
0.63 mg/ml Phosphorylase <u>a</u> + 0.50 mg/ml TNI-P	0.16
0.31 mg/ml Phosphorylase <u>a</u>	0.09
0.31 mg/ml Phosphorylase <u>a</u> + 0.50 mg/ml TNI-P	0.07

Tab. 13: Einfluß von phosphoryliertem TNI auf die Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase

3.12.6. Einwirkung von Triton X-100 auf die Aktivität der Protein-Phosphatasen

Die Protein-Phosphatasen wurden mit steigender Konzentration von 0.1 - 1.0 % Triton X-100 versetzt und die Aktivität der Enzyme, wie unter 2.2.6./2.2.7. angegeben, bestimmt.

Die Phosphorylase-Phosphatase-Aktivität blieb unverändert, während die TNI- und TNT-Phosphatase-Aktivitäten schon bei 0.1 % Triton zu 100 % gehemmt wurden (siehe Abb. XXII).

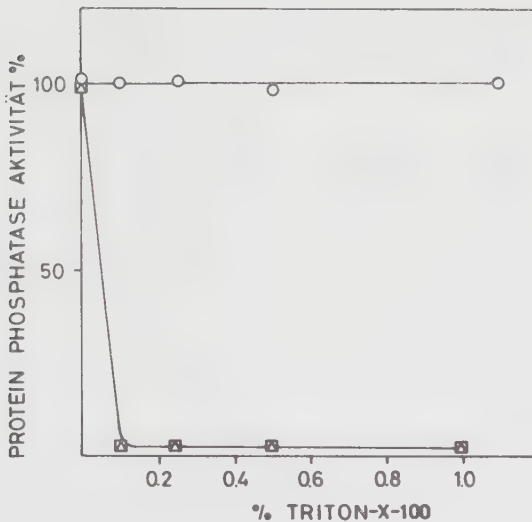


Abb. XXII: Einwirkung von Triton X-100 auf die Aktivität der Protein-Phosphatasen

1.8 mg/ml Protein-Phosphatasen wurden mit 0.1 - 1 % Triton x-100 versetzt und für 15 Minuten bei 30 ° C inkubiert. Die Aktivität der Protein-Phosphatasen wurden, wie unter 2.2.6./2.2.7. beschrieben, getestet.

3.12.7. Hemmung der Protein-Phosphatasen durch hitzestabiles
Inhibitorprotein

30 µg/ml Inhibitor-Protein (präpariert nach GILLAN und COHEN 1978) wurde in einem Ansatz von 0.22 ml mit (0.046 mg/ml) Protein-Phosphatasen versetzt und die Aktivität der Protein-Phosphatasen, wie unter 2.2.6./2.2.7. beschrieben, getestet.

Die Phosphorylase-Phosphatase wurde zu 50 % gehemmt. Unter den gleichen Bedingungen konnten die TNT- und TNI-Phosphatase zu 25 % gehemmt werden.

4. DISKUSSION

Kinasen, die Proteine phosphorylieren, sind seit langem bekannt.

Zwei Typen von Protein-Kinasen sind aus Skelettmuskel homogen isoliert oder gut charakterisiert worden.

Der erste Typ stellt Ca^{2+} -abhängige Protein-Kinasen dar, wie z.B. Phosphorylase-Kinase (COHEN et al. 1978), Myosin Light-Chain-Kinase (PIRES et al. 1977), Troponin-Kinase (DICKNEITE und HEILMEYER 1978), Calsequestrin-Kinase (VARSÁNYI und HEILMEYER 1979) und Glykogen-Synthetase-Kinase (ROACH et al. 1978, NIMMO et al. 1976 und CANDWELL et al. 1978).

Zum zweiten Typ gehören cAMP-abhängige Protein-Kinasen; als Beispiel mögen folgende Protein-Kinasen aus Herzmuskel (BROSTROM et al. 1971, RUBIN et al. 1972) und aus Skelettmuskel (REIMANN et al. 1971, BEAVO et al. 1974) genannt werden.

Im Gegensatz zu den Kinasen wissen wir weniger über die Phosphatasen, die die phosphorylierten Proteine dephosphorylieren.

Es ist bekannt, daß partiell gereinigte Phosphorylase-Phosphatase (GRATECOS et al. 1974, 1977), Myosin Light-Chain-Phosphatase (MORGAN et al. 1976) und die generelle Protein-Phosphatase (Glykogen, Synthetase-Phosphatase, α - bzw. β -Phosphorylase Kinase-Phosphatase, sowie Histon-Phosphatase (COHEN et al. 1977)) verschiedene Phosphatasen sind.

Phosphorylase-Phosphatase konnte mit klassischen Mitteln nur unter großem Aufwand und unzureichenden Ergebnissen gereinigt werden (HURD et al. 1967). Außerdem war die durch GRATECOS et al. (1974) 2.000 - 6.000-fach gereinigte aktive Spezies von Phosphorylase-Phosphatase in der Polyacrylamidgelelektrophorese nicht einheitlich.

Über die Spezifität der Protein-Phosphatasen wurden zwei Hypothesen aufgestellt:

- I) Protein-Phosphatasen sind Substrat-unspezifische allgemeine Enzyme. Sie dephosphorylieren alle Proteine, die von Ca^{2+} -abhängigen oder cAMP-abhängigen Protein-Kinasen phosphoryliert wurden (KATO und BISHOP 1972, ENGLAND et al. 1972, STULL et al. 1972, ZIEVE und GLINSMANN 1973, NAKAI und THOMAS 1974, KATO und SATO 1974, KILLILEA et al. 1975, HSIAO et al. 1976, KATO et al. 1974).
- II) Protein-Phosphatasen sind spezifische Enzyme; jedes phosphorylierte Protein wird von einer spezifischen Protein-Phosphatase dephosphoryliert (ANTONIW et al. 1977, NIMMO und COHEN 1978, GRATECOS et al. 1977).

Eine Spezifität der Protein-Phosphatasen wurde durch unterschiedliches Verhalten bei der Hemmung durch Inhibitorprotein nachgewiesen.

Ein hitzestabiles und trypsinlabiles Inhibitorprotein ist in der Lage, die Phosphorylase-Phosphatase zu hemmen (BRAND et al. 1975, HUANG und GLINSMANN 1976). Später wurde von zwei Inhibitoren berichtet, die sich bei der Hemmung der Protein-Phosphatasen unterschiedlich verhielten, wenn verschiedene phosphorylierte Substrate verwendet wurden (COHEN et al. 1977, ANTONIW et al. 1977, NIMMO und

COHEN 1978).

Die Untersuchung von STULL et al. (1972), ENGLAND et al. (1972) und KREBS et al. (1973) weisen auf die Identität der Phosphorylase-Phosphatase mit TNI-Phosphatase hin. Möglicherweise beruht die Gleichheit darauf, daß isoliertes TNI als Substrat verwendet wurde. Keine Untersuchungen wurden mit dem Holotroponinkomplex durchgeführt. Ebenso unbekannt ist die TNT-Phosphatase und die Frage, ob sie mit Phosphorylase-Phosphatase identisch ist.

Zur Klärung der oben genannten Hypothesen war es erforderlich, eine Methode auszuarbeiten, die uns erlaubt, die Protein-Phosphatasen partiell anzureichern.

Die Protein-Phosphatasen wurden aus Kaninchen Skelettmuskel isoliert und mehreren Reinigungsschritten unterworfen (siehe Tab. 8).

Der Aktivitätsverlauf wurde durch die Anreicherungs-schritte anhand von drei phosphorylierten Proteinen wie Phosphorylase a, TNT-P und TNI-P verfolgt. Die Aktivität der Protein-Phosphatasen hat bei den ersten zwei Reinigungsschritten im gleichen Verhältnis zugenommen. Alle drei Phosphatasen wurden bei der Gelfiltration mit identischem apparenten Molekulargewicht von 250.000 eluiert.

Ein natives Molekulargewicht von 260.000 wurde ebenfalls für Phosphorylase-Phosphatase von DJOVKAR (1974) und MELLGREN et al. (1979) beschrieben.

Die Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit für TNI-P und TNT-P, die im Holotroponinkomplex enthalten sind, ist identisch, während für Phosphorylase a ein ca. 3-fach kleinerer K_m -Wert bestimmt wurde. Der V_{max} -Wert ist mit dem Substrat TNI-P 4-fach und mit TNT-P

2-fach größer als mit Phosphorylase a.

Hingegen beobachteten ENGLAND et al. (1972) einen identischen K_m -Wert für isoliertes TNI-P und Phosphorylase a, jedoch war der V_{max} -Wert für Phosphorylase 4-fach kleiner. KHANDELWAL et al. (1976) berichteten ebenfalls von einem identischen K_m -Wert für Phosphorylase a und isoliertes TNI-P der Phosphatase im Lebergewebe.

Die Chromatographie der Protein-Phosphatasen an Histon-Sepharose, sowie die nachfolgende Gelfiltration über Sepharose 6-B in Anwesenheit von 0.5 M KCl, trennten hauptsächlich die TNT-Phosphatase (Fraktion I) von TNI-, bzw. Phosphorylase-Phosphatase (Fraktion II, siehe Tab. 8) ab. Bei den letztgenannten Schritten änderte sich das Aktivitätsverhältnis von Phosphorylase a/TNI-Phosphatase um das 3-fache, während das Aktivitätsverhältnis von Phosphorylase a/TNT-Phosphatase um das 60-fache anstieg.

Bei der oben genannten Trennung der Protein-Phosphatasen erfolgte gleichzeitig eine Änderung des apparenten Molekulargewichtes der Protein-Phosphatasen. Vor diesen beiden Schritten betrug das apparente Molekulargewicht aller drei Phosphatasen 250.000, danach das der TNT-Phosphatase in Anwesenheit von 0.5 M KCl 105.000 und das der TNI- bzw. Phosphorylase-Phosphatase 65.000.

Eine Erhöhung des Molekulargewichtes der beiden getrennten Fraktionen I bzw. II wurde jedoch festgestellt, wenn das Salz entfernt wurde. Unter diesen Bedingungen besaß die TNT-Phosphatase ein Molekulargewicht von 150.000 und die Phosphorylase- bzw. TNI-Phosphatase ein Molekulargewicht von 120.000, was immer noch wesentlich kleiner war, als es vor der Auftrennung der Phosphatasen bestimmt wurde.

Eine Änderung des Molekulargewichtes von 98.000 bis 33.000 sowie eine 40 - 96 % Inaktivierung der Phosphorylase-Phosphatase durch Anwendung von 0.1 - 0.4 M NaCl bei der Reinigung wurde von GRATECOS et al. (1977) beschrieben. Ein multiples Molekulargewicht von 300.000 bis 32.000 wurde von verschiedenen Autoren für Phosphorylase-Phosphatase beschrieben (HURD et al. 1966, 67, KATO und SATO 1974, GRATECOS et al. 1973, 74, COHEN 1974, 1976 und KATO et al. 1974).

Phosphorylase-Phosphatase konnte bisher mit klassischen Mitteln nur sehr aufwendig und mit kleinen Ausbeuten gereinigt und deshalb nicht gut charakterisiert werden (HURD et al. 1967, ENGLAND et al. 1972 und BRAND et al. 1975).

GRATECOS et al. (1973, 1977) erreichten durch Chromatographie an Polylysin-Sepharose in Gegenwart von 8 M Harnstoff und durch anschließendes Entfernen harnstoffdenaturierter Proteine eine 2000 - 6000-fache Anreicherung der Phosphatase; das so gewonnene Material bestand in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese aus zwei Banden mit etwa identischer spezifischer Aktivität. Nach der Vorstellung von GRATECOS et al. (1974) stellen diese multiplen Protein-Banden einen aggregierten Zustand der Phosphorylase-Phosphatase dar, da die weitere Reinigung der Phosphorylase-Phosphatase nicht zur Anreicherung und Homogenität des Enzyms führte.

Weiterhin wurde eine aktive Spezies der Phosphorylase-Phosphatase mit einem Molekulargewicht von 30.000 durch Dissoziation mit schwach denaturierenden Reagenzien wie 100 mM Mercaptoäthanol (KOBAJASCHIE et al. 1975), 80 - 95 % Äthanol (BRAND et al. 1974, 1975, COHEN 1977)

oder 8 M Harnstoff (GORIS und MERLEWEDE 1974) gewonnen.

Nach unseren Untersuchungen führten jedoch 20 mM Mercaptoäthanol im Präparationspuffer zur Denaturierung des Enzymkomplexes und 50 % Äthanol zu einem 60 %igen Aktivitätsverlust der Phosphorylase-Phosphatase. In Anwesenheit von 8 M Harnstoff im Reaktionsansatz verlor die TNT-Phosphatase innerhalb von 2 Minuten und TNI-Phosphatase innerhalb von 4 Minuten 90 % ihrer Aktivität. Die Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase blieb unbeeinflusst (siehe Abb. XIX).

Bei Prüfung der Homogenität der nach unserer Methode hergestellten Protein-Phosphatasen durch diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese konnten multiple Protein-Banden beobachtet werden. Durch dieses Verfahren wurde eine Trennung der Protein-Phosphatasen in Phosphorylase-, TNI- und TNT-Phosphatase erreicht. Alle Protein-Banden enthielten Protein-Phosphatase-Aktivitäten. Protein-Banden konnten entsprechend den Protein-Phosphatase -Aktivitäten zugeordnet werden (siehe Abb. XIV ,XV).

Hingegen berichteten ENGLAND et al. (1972) von einer identischen elektrophoretischen Mobilität der TNI- und Phosphorylase-Phosphatase unter den gleichen Bedingungen.

Das atypische Verhalten der Phosphorylase-Phosphatase-Aktivität bei der Verdünnung, das von FISCHER und HURD (1967) beschrieben wurde, konnte durch Zugabe von 0,1 mM Mn^{2+} aufgehoben werden (DJOVKAR 1974).

Der Verdünnungseffekt ist möglicherweise auf Dissoziation eines Enzymkomplexes bei der Verdünnung zurückzuführen. Dieser Effekt wurde als Folge der Verdünnung von Inhi-

bitorproteinen beschrieben (DETWILER et al. 1977; BRAND et al. 1974, 1975; HUANG und GLINSMANN 1975, 1976).

Der Einfluß von Metallionen auf die Aktivität der Protein-Phosphatasen ist ungeklärt. KELLER und CORI (1954) zeigten eine Hemmung der partiell gereinigten Phosphorylase-Phosphatase durch 0.5 mM Mn^{2+} . Unter gleichen Bedingungen berichteten CORI und CORI (1945) von einer 3-fachen Aktivierung der Phosphorylase-Phosphatase; kein Effekt wurde aber bei Zugabe von 0.5 mM Co^{2+} beobachtet. Ebenfalls keinen Einfluß von Metallionen auf Phosphorylase-Phosphatase haben HURD et al. (1966/67) festgestellt. Für die Phosphorylase-Phosphatase wurde eine Metall-Bindungsstelle beschrieben (BIRKETT und DWIK 1971). Eine kompetitive Hemmung der Phosphorylase-Phosphatase durch 2.5 mM Mn^{2+} oder Mg^{2+} wurde von MARTENSEN et al. (1973) gezeigt. KANEFUSIE und KATO (1974) und DJOVKAR (1974) berichteten von einer Mn^{2+} - und Co^{2+} -stimulierten und nicht stimulierten Phosphorylase-Phosphatase.

Die Metallionen-Abhängigkeit der TNI- und TNT-Phosphatase ist bisher in der Literatur nicht beschrieben worden. Nach unseren Untersuchungen führten 0.1 mM Mn^{2+} in der S_{II} -Fraktion zur 2 - 3-fachen Aktivierung der Phosphorylase- und TNT-Phosphatase bei einem K_a -Wert von 1×10^{-5} M, während die TNI-Phosphatase unbeeinflusst blieb (siehe Tabelle 11). Dagegen wurde für Phosphorylase-Phosphatase ein K_a -Wert von 0.8 mM für Mn^{2+} beschrieben (KATO und SATO 1974). Werden die Protein-Phosphatasen weiter angereichert, dann verändert sich die Mn^{2+} -Aktivierung.

Phosphorylase-Phosphatase verlor unter den oben genannten Bedingungen die Mn^{2+} -Aktivierung, während die TNT-Phosphatase eine erhöhte 10-fache Aktivierung zeigte.

Dagegen wurde eine 70 %ige Hemmung der TNI-Phosphatase beobachtet (siehe Tab. 12).

Möglicherweise verursachte die Trennung des Protein-Phosphatasen-Komplexes eine Änderung der Mn^{2+} -Bindungsstellen.

Während der Inkubation der Protein-Phosphatasen mit Trypsin bei $30^{\circ}C$ für 20 Minuten blieb die Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase unverändert. Die TNT-Phosphatase verlor jedoch in 4 Minuten, und TNI-Phosphatase in 16 Minuten 90 % ihrer Aktivität (siehe Abb. XVIII)-

Die Protein-Phosphatasen verhielten sich unterschiedlich während einer Inkubation bei $50^{\circ}C$. Die Phosphorylase-Phosphatase verlor 50 % ihrer Aktivität innerhalb von 30 Minuten, während TNI-Phosphatase nach 14 Minuten und die TNT-Phosphatase bereits nach 4 Minuten nur die Hälfte ihrer Anfangsaktivität besaßen (siehe Tab. 14, Abb. XX).

Der Einfluß von KCl auf die drei Protein-Phosphatasen war ebenfalls verschieden.

In Gegenwart von 0.12 M KCl wurde die TNT- und TNI-Phosphatase zu 50 % gehemmt. Die gleiche Hemmung konnte bei der Phosphorylase-Phosphatase mit 0.25 M KCl erreicht werden.

Als weiteres Kriterium zur Differenzierung der Protein-Phosphatasen wurde die Einwirkung von Triton X-100 auf die Protein-Phosphatasen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase unbeeinflusst blieb, während die TNI- und TNT-Phosphatase bei 0.1 % Triton X-100 zu 100 % gehemmt wurde (siehe Abb. XXII).

Behandlung	Phosphorylase- Phosphatasen	TNI- Phosphatase	TNT- Phosphatase
Trypsin	insensitiv	sensitiv	sensitiv
8 M Harnstoff	stabil	instabil	instabil
0.1 mM $MnCl_2$	kein Einfluß	3-fache Hemmung	10-fache Aktivierung
Inkubation bei 50° C	stabil	instabil	instabil
Hemmung durch 0.05 % Triton	0 %	50 %	50 %
50 % Hemmung durch KCl	0.25 M	0.12 M	0.12 M
Hemmung durch hitzeinstabiles Inhibitorprotein	50 %	25 %	25 %

Tab. 14: Vergleich der Eigenschaften von Protein-Phosphatasen

Die gereinigte Phosphorylase-Phosphatase verhielt sich ebenfalls resistent gegen Trypsin, 8 M Harnstoff und Triton X-100 (GRATECOS et al. 1977). ENGLAND et al. (1972) beobachteten

eine Denaturierung der Phosphorylase-Phosphatase und TNI-Phosphatase bei Hitzeeinwirkung. Die Phosphorylase-Phosphatase wurde durch Inhibitor-Protein II bis zu 50 % gehemmt (COHEN 1978). Unter gleichen Bedingungen konnte die TNI- und TNT-Phosphatase nur zu 25 % gehemmt werden (siehe Tab. 14).

Eine Hemmung der Protein-Phosphatasen durch Inhibitor wurde ebenfalls von COHEN et al. (1977), BRAND und LEE (1975) und HUANG und GLINSMANN (1976, 77) beobachtet. Die gleichzeitige Anwesenheit der phosphorylierten Substrate beeinflusste die Aktivität der einzelnen Phosphatasen nicht (siehe Tab. 13). Dagegen wurde eine kompetitive Hemmung der Phosphorylase-Phosphatase in Gegenwart der phosphorylierten isolierten TNI- mit einer Inhibitorkonstante von 5 μ M beobachtet (ENGLAND et al. 1972).

Nicht nur die Substratspezifität, die Veränderung des Aktivitätsverhältnisses während der Reinigung, kinetische Daten, die Mn^{2+} -Abhängigkeit und elektrophoretische Mobilität geben uns direkte Beweise über die Verschiedenheit der Protein-Phosphatasen, sondern auch das unterschiedliche Verhältnis bei der Benutzung verschiedener Reagenzien, was die ursprüngliche Annahme der Identität von Phosphorylase- und TNI- bzw. TNT-Phosphatase widerlegt.

Wahrscheinlich existieren in den Protein-Phosphatasen verschiedene katalytische Untereinheiten, die spezifisch für jedes Proteinsubstrat sind und möglicherweise in einem Komplex vorliegen.

Die Trennung konnte allerdings wahrscheinlich erst dadurch erreicht werden, daß ein solcher Komplex zur Dissoziation gebracht wurde.

Die Protein-Phosphatasen dephosphorylieren verschiedene phosphorylierte Proteine, die verschiedene Funktionen im Stoffwechsel haben. Welche physiologische Rolle bei der Regulation des Phosphorylierungsgrades den Protein-Phosphatasen zugeordnet werden soll, ist völlig ungeklärt. Nach unseren Ergebnissen ergibt die Phosphorylierung und

Dephosphorylierung folgendes mögliche Bild für das im Muskel ablaufende Geschehen (siehe Abb. XXIII).

a) nach einer Adrenalinausschüttung wird membrangebundene Adenylcyclase stimuliert. Dies führt zum Anstieg des interzellulären $3' \ 5'$, cAMP-Spiegels und dadurch zur Aktivierung einer $3' \ 5'$, cAMP-abhängigen Protein-Kinase. Die aktivierte Protein-Kinase phosphoryliert die TNI-Untereinheit im Holotropenin. Dieser Phosphateinbau steht gleichzeitig unter der Kontrolle der TNC-Untereinheit und damit über die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration unter nervöser Kontrolle. Der Vorgang wird möglicherweise durch TNT moduliert. Somit ist das gesamte System eng mit der Regulation der Actomyosin-ATPase verknüpft. Die ATPase hydrolysiert ATP, das die Energie zur Kontraktion liefert (SZENT-GYÖRGYI 1955).

b) Bei der durch einen nervösen Impuls ausgelösten Ca^{2+} -Ausschüttung in der Zelle kann eine Seite der TNT-Untereinheit im Holotroponinkomplex phosphoryliert werden. Durch Ca^{2+} -Ionen wird gleichzeitig Phosphorylase-Kinase aktiviert, wodurch in der Zelle Phosphorylase von der b- in die a-Form überführt wird (FISHER et al. 1955).

Die Dephosphorylierung eines jeden dieser phosphorylierten Proteine wird durch eine spezifische Phosphatase katalysiert. Möglicherweise sind diese drei Phosphatasen zusammen mit anderen Phosphatasen in einem Komplex enthalten. Dadurch könnte eine koordinierte Regulation der Dephosphorylierung erreicht werden. Außer der Hemmung der Protein-Phosphatasen durch Protein-Inhibitoren ist bisher allerdings wenig bekannt. Die Charakterisierung der einzelnen Protein-Phosphatase-Aktivitäten bietet jetzt eine Möglichkeit, solche Regulationen zu studieren.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Phosphorylierte Proteine wie Phosphorylase α , Tropomyosin-bindende Untereinheit im Troponin (TNT-P) und Actomyosin-Inhibitor-Untereinheit im Troponin (TNI-P) können von Protein-Phosphatasen dephosphoryliert werden.

Diese drei Phosphatasen wurden durch folgende Reinigungsschritte aus Kaninchen-Skelettmuskel angereichert.

- a) hydrophobe Chromatographie über Methylamin Sepharose (12 - 15 μ mol Amin/ml gepacktes Gel)
- b) Gelfiltration über Sepharose 6-B
- c) Chromatographie an Histon-Sepharose
- d) Gelfiltration über Sepharose 6-B in Anwesenheit von 0.5 M KCl

Die ersten zwei Reinigungsschritte reichern die Aktivitäten aller drei Protein-Phosphatasen im gleichen Verhältnis an. Der K_m -Wert von TNI- und TNT-Phosphatasen ist identisch, während die Phosphorylase zweifach kleineren K_m -Wert als TNI und Phosphorylase aufweist. Die Elutionsprofile bei der Gelfiltration in Abwesenheit von KCl und somit das apparente Molekulargewicht sind identisch.

Chromatographie über Histon-Sepharose sowie die nachfolgende Gelfiltration über Sepharose 6-B in Anwesenheit von 0.5 M KCl trennen hauptsächlich die TNT- von TNI- und Phosphorylase-Phosphatase ab. Folgende Kriterien weisen darauf hin, daß die drei Protein-Phosphatasen nicht identisch sind:

Während der Reinigung ändert sich das Aktivitätsverhältnis von Phosphorylase- TNI-Phosphatase um das 3-fache,

während das Aktivitätsverhältnis von Phosphorylase- TNT-Phosphatase um das 60-fache ansteigt.

Ein Vergleich der drei Phosphatasen zeigt unterschiedliches Verhalten nach der Behandlung mit verschiedenen Reagenzien. Als Beispiel sei die Mn^{2+} -Aktivierbarkeit zu nennen. Die TNT-Phosphatase läßt sich in Gegenwart von 0.1 mM $MnCl_2$ 10-fach aktivieren. Unter den gleichen Bedingungen wird eine 3-fache Hemmung der TNI-Phosphatase festgestellt. Auf die Phosphorylase-Phosphatase wird kein Einfluß gemessen. Die Inkubation der Protein-Phosphatasen in Anwesenheit von 8 M Harnstoff beeinflußt nicht die Aktivität der Phosphorylase-Phosphatase, während die TNT- und TNI-Phosphatase nach unterschiedlicher Inkubationszeit inaktiviert werden.

Bei Hitzeeinwirkung verhalten sich die Protein-Phosphatasen unterschiedlich. Die Phosphorylase-Phosphatase-Aktivität bleibt in Anwesenheit von 0.1 % Triton X-100 unverändert, während die TNT- und TNI-Phosphatase zu 100 % gehemmt werden. Gleichzeitige Anwesenheit der phosphorylierten Substrate beeinflußt nicht die Aktivität der einzelnen Phosphatasen.

Die Hemmung von KCl zeigt ebenfalls das unterschiedliche Verhalten der Protein-Phosphatasen.

Eine 50 %ige Hemmung der Phosphorylase Phosphatase werden durch ein hitzestabiles Inhibitorprotein gemessen. Unter der gleichen Bedingung werden die TNT- und TNI-Phosphatase zu 25 % gehemmt. Ein Vergleich der Eigenschaften der Protein-Phosphatasen sowie ihre Trennung in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese weisen auf die Existenz dreier verschiedener Protein-Phosphatasen hin.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- ANTONIWI, J.F., NIMMO, H.G., YEAMAN, S.T. und COHEN, P.
(1977) Biochem. J. 162, 423 - 433
- BAILEY, C., VILLAR-PALASI (1971) Fed. Proc. 30, 1147, Abs.
- BEAVO, J.A., BECHTEL, P.J. und KREBS, E.G. (1975)
Methods Enzymol. 38, 299 - 308
- BIRKETT, D.J., DWEK, A.A., RADDA, G.K., RICHARDS, R.E.
und SALMON, A.G. (1971) Eur. J. Biochem. 20,
494 - 508
- BRAND, H., LEE, E.Y.C. und KILLILEA, S.D. (1975)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 63, 950 - 956
- BRAND, H., KILLILEA, S.D. und LEE, E.Y.C. (1974)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 61, 598-604
- BROSTROM, C.O., REIMANN, E.M., WALSH, D.A. und KREBS, E.G.
(1971) Advan. Enzyme Regul. 8, 191 - 203
- BROSTROM, C.O., HUNKLER, F.L., KREBS, E.G. (1971)
J. Biol. Chem. 246, 1961 - 1967
- CANDWELL, B., ANTONIWI, D.F. und COHEN, P. (1978)
Eur. J. Biochem. 86, 511 - 518
- CLELAND, W.W. (1967) Adv. Enzymol. 29, 1 - 32
- COHEN, P., ANTONIWI, J.F., DAVISION, M., TAYLOR, C. (1974)
in: Metabolic Interconversion of Enzyme
(FISCHER, E.H., KREBS, E.G., NEURATH, H., STADTMAN,
E.R.) Hrsg. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg,
New York 3, P. 185
- COHEN, P. (1973) Eur. J. Biochem. 34, 1 - 14

- COHEN, P., BURCHELL, A., FOULKES, J.G., COHEN, P.T.W.,
VANAMAN, T.C. und NAIRN, A.G. (1978) Febs Letters
92, 287 - 293
- COHEN, P., NIMMO, G.A. und ANTONIW, J.F. (1977) Biochem.
J. 162, 435 - 444
- CORI, G.T., CORI, C.F. (1945), J. Biol. Chem. 158, 321
- CUATRECASAS, P. (1970) J. Biol. Chem. 245, 3059 - 3065
- DE LANGE, R.J., KEMP, R.G., RILEY, W.D., COOPER, R.A.,
KREBS, E.G. (1968) J. Biol. Chem. 243, 2200 - 2208
- DICKNEITE, G., JENNISSEN, P., HEILMEYER, L.M.G., Jr.
(1978) Febs Letters 87, 297 - 301
- DJOVKAR, A. und HEILMEYER, L.M.G., Jr. (1978) Hoppe-
Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 1075
- DJOVKAR, A., HÖRL, W.H., KOHSE, K.P., VARSANYI, M. und
HEILMEYER, L.M.G., Jr. (1977) Hoppe-Seyler's Z.
Physiol. Chem. 358, 1389 - 1390
- DJOVKAR, A. (1974) Diplomarbeit, Julius-Maximilians-Uni-
versität, Würzburg
- EBASHI, S., WAKABAYASHI, T. und EBASHI, F. (1971)
J. Biochem. 69, 441 - 445
- EBASHI, S. (1972), J. Biochem. (Tokyo) 72, 787 - 790
- EBASHI, S. (1974) Lipmann Symposium: Energy, Biosynthesis
and Regulation in Biology, Walter de Gruyter, Ber-
lin, New York, P. 165
- ENGLAND, P.J., STULL, J.T., KREBS, E.G. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 5275 - 5277

- ENGLAND, P.J., STULL, J.T., HUANG, T.S. (1973) Metabolic Interconversion of Enzymes, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, p. 175 - 184
- FISCHER, E.H., KREBS, E.G. (1955) J. Biol. Chem. 216, 121 - 132
- FISCHER, E.H. und KREBS, E.G. (1958) J. Biol. Chem. 231 65 - 75
- FISCHER, E.H., HEILMEYER, L.M.G., Jr. und HASCHKE (1971) in: Current Topics in Cellular Regulations 4, 211 - 251
- FISCHER, E.H., BECKER, J.U., BLUM, H.E., BYERS, B., HEIZMANN, C., GERRICK, G.W., LEHKY, P., MALENCIK, D.A., POBINWONG (1976) in: Molecular Basis of Motility (26. Colloquium-Mosbach 1975, HEILMEYER, L.M.G., Jr., RÜEGG, J.C., WIELAND, Th., Hrsg.) P. 137, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York
- FLODIN, P. (1961) J. Chromatography 5, 103 - 115
- GLYNN, J.M. und CHAPPEL, J.B. (1964) Biochem. J. 90, 147 - 149
- GORIS, J., KALALA, L.R. und MERLEVEDE, W. (1974) Arch. Int. Physiol. Biochem. 82, 988 - 990
- GRATECOS, D. und FISCHER, E.H. (1973) Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 32, 578
- GRATECOS, D., DETWILER, T.C. und FISCHER, E.H. (1974) in: Metabolic Interconversion of Enzymes (FISCHER, E.H., KREBS, E.G., NEURATH, H. und STADTMAN, E.R., Hrsg.) P. 43 - 52, Springer-Verlag, New York
- GRATECOS, D. und FISCHER, E.H. (1974) J. Biochem. Biophys. Res. Commun. 58, 960 - 967

- GRATECOS, D., DETWILER, T.C., HURD, S. und FISCHER, E.H.
(1977) Biochem. 16, 4812 - 4817
- GREASER, M.L., YAMAGUCHI, M., BREKKE, POTTER, J. und
GERGELY, J. (1972) Gold Spring Harbar Symposia on
Quant. Biol. 37, 235 - 244
- GREASER, M.L., GERGELY, J. (1971) J. Biol. Chem. 246,
4226 - 4233
- HARTSHORNE, D.H., PYUN, H.Y. (1971) Biochem. Biophys.
Acta 229, 698 - 711
- HASCHKE, R.H., HEILMEYER, L.M.G., Jr., MEYER, F. und
FISCHER, E.H. (1970) J. Biol. Chem. 245, 6657 - 6663
- HASCHKE, R.H. und HEILMEYER, L.M.G., Jr. (1972) Anal.
Biochem. 47, 451 - 456
- HAYAKAWA, T., PERKINS, J.P., WALSH, D.A. und KREBS, E.G.
(1973) Biochem. 12, 574 - 579
- HEDRICK, J.L. und SMITH, A.J. (1968) Archives of Biochem.
and Biophys. 126, 155 - 164
- HEILMEYER, L.M.G., Jr., VARSÁNYI, M., GRÖSCHEL-STEWART, U.,
KILLIMANN, M.W., DJOVKAR, A., HÖRL, W.H., JENNISSEN,
H.P. und DICKNEITE, G. (1978) in: Regulatory Mecha-
nisms of Carbohydrate Metabolism (11th Febs Metting,
Copenhagen 1977, Symposium A.I.), (V. ESMAN, Hrsg.),
Vol. 42, P. 119, Pergamon Press, Oxford, New York
- HEILMEYER, L.M.G., Jr., MEYER, F., HASCHKE, R.H. und
FISCHER, E.H. (1970) J. Biol. Chem. 245, 6649 - 6656
- HELMREICH, E. (1969) Febs Symposium 19, 131
- HSIAO, K.J., SANDBERG, A.R. und CHUN, H. (1978) J. Biol.
Chem. 253, 6901 - 6907

- HUANG, F.L. und GLINSMANN, W.H. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 72, 3004 - 3008
- HUANG, F.L. und GLINSMANN, W.H. (1976) Febs Letters 62, 326 - 329
- HUANG, F.L. und GLINSMANN, W.H. (1976) Eur. J. Biochem. 70, 419 - 426
- HURD, S.S. (1967) Ph. D. Thesis, University of Washington
- HURD, S.S., NOVOA, W.B., HICKENBOTTOM, J.P. und FISCHER, E.H. (1966) Methods Enzymol. 8, 546 - 550
- JENNISSEN, H.P. und HEILMEYER, L.M.G., Jr. (1975) Biochem. 14, 754 - 760
- JENNISSEN, H.P. und HEILMEYER, L.M.G., Jr. (1974 a) Anal. Biochem. 57, 118 - 126
- JENNISSEN, H.P. und HEILMEYER, L.M.G., Jr. (1974) Febs Letters 42, 77 - 80
- KATO, K., KOBAYASHI, M. und SATO (1974) Biochem. Biophys. Acta 371, 89 - 101
- KATO, K. und SATO, S. (1974) Biochem. Biophys. Acta 358, 299 - 307
- KATO, K. und BISHOP, J.S. (1972) J. Biol. Chem. 247, 7420 - 7429
- KELLER, P.J. und CORI, G.T. (1954) in: Methode in Enzymology, 1, P. 206 (COLOWICK, S.P. und KAPLAN, N.O., eds.) Academic Press, New York
- KHANDEWAL, R.L., VANDENHEEDE, J.R. und KREBS, E.G. (1976) J. Biol. Chem. 251, 4850 - 4858

- KILLILEA, S.D., BRAND, H., LEE, E.Y.C. und WHELAN, W.J.,
(1976) J. Biol. Chem. 251, 2363 - 2368
- KILLILEA, S.D., METIEH, M.E. and LEE, E.Y.C. (1976)
Fed. Proc. 35, 268 Abs.
- KILLILEA, S.D., LEE, E.Y.C., BRAND, H. und WHELAN, W.J.
(1975) in: Metabolic Interconversion of Enzymes
(S. SHALTEIL, ed.) Springer-Verlag, New York (1976)
p. 103 - 114
- KOBAYASHI, K., KATO, K., SATO, S. (1975) Biochem. Biophys.
Acta 377, 343 - 355
- KREBS, E.G. (1972) Current Topics Cell. Regul. 5, 99 - 133
- KREBS, E.G. und FISCHER, E.H. (1956) Biochem. Biophys.
Acta 20, 150 - 157
- KREBS, E.G., KENT, A.B. und FISCHER, E.H. (1958) J. Biol.
Chem. 231, 73 - 83
- KREBS, E.G., STULL, J.T., ENGLAND, P.J., HUANG, T.S.,
BROSTROM, C.O. und VANDENHEEDE, J.R. (1973)
Protein Phosphorylation in Control Mechanisms
Academic Vol. 5, P. 31 - 45, Press New York. London
- KUO, J.F. und GREENGARD, P. (1970) Biochem. Biophys. Acta
212, 434 - 440
- LINEWEAVER, H. und BURK, D. (1934) J. Amer. Chem. Soc.
56, 658 - 666
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, H.J., FARR, A.L., RANDALL, R.L.
(1951) J. Biol. Chem. 193, 265 - 275
- MANS, R.J. und NOVELLI, G.D. (1961) Arch. Biochem.
Biophys. 94, 48 - 53
- MARTERSEN, T.M., BROTHERTON, J.E. und GRAVES, D. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 8323 - 8328

- MELLGREN, R.L., AYLWARD, J.H., KILLILEA, D. und LEE, E.Y.
(1979) J. Biol. Chem. 25, 648 - 652
- MICHAELIS, L. und MENTEN, M.L. (1913) Biochem. Z. 49, 333
- MORGAN, M., PERRY, S.V. und OTTAWAY, J. (1976) Biochem.
Z. 157, 687 - 697
- NAKAI, C. und THOMAS, J.A. (1974) Biochem. Biophys. Res.
Commun. 52, 530 - 536
- NAKAI, C. und THOMAS, J.A. (1974) J. Biol. Chem. 249,
6459 - 6467
- NEVILLE, D.M., Jr. (1971) J. Biol. Chem. 246, 6328 - 6334
- NIMMO, H.G., PROUD, C.G. und COHEN, P. (1976) Eur. J.
Biochem. 68, 21 - 30
- NIMMO, H.G. und COHEN, P. (1978) Eur. J. Biochem. 87,
353 - 365
- OZAWA, E. (1972) J. Biochem. (Tokyo) 71, 321 - 331
- PEARLSTONE, J.R., JOHNSON, P., CARPENTER, M.R. und
SMILLIE, L.B. (1977) J. Biol. Chem. 252, 983 - 989
- PERRY, S.V., COLE, H.A., HEAD, J.F. und TRAYER, J.P. (1972)
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37, 251 - 262
- PERRY, S.V. und COLE, H.A. (1973) Biochem. J. 131,
425 - 428
- PERRY, S.V. und COLE, H.A. (1974) Biochem. J. 141,
733 - 743
- PIRES, E.M.V. und PERRY, S.V. (1977) Biochem. J. 167,
137 - 146

- PRATJE, E. und HEILMEYER, L.M.G., Jr. (1972) Febs Letters
27, 89 - 93
- PRATJE, E. und HEILMEYER, L.M.G., Jr. (1973) in: Metabolic
Interconversion of Enzymes (FISCHER, E.H., KREBS,
E.G., NEURATH, H., STADTMAN, E.R., Hrsg.) Springer-
Verlag Berlin, Heidelberg, New York, P. 185 - 195
- RALL, T.W., SUTHERLAND, E.W., WOSILAIT, W.D. (1956)
J. Biol. Chem. 218, 483 - 495
- REIMANN, E.M., WALSH, D.A. und KREBS, E.G. (1971) J. Biol.
Chem. 246, 1986 - 1995
- ROACH, P.J., DE PAOLI-ROACH, A.A. und LARNER, J. (1978)
Journal of Cyclic Nucleotide Research, 4, 245 - 257
- RUBIN, C.S. und ROSEN, O.M. (1975) Annual Review of Biochem.
44, 831 - 887
- RUBIN, C.S., ERLICHMAN, J. und ROSEN, O.M. (1972) J. Biol.
Chem. 247, 36 - 44
- SHIMAZU, T., AMAKAWA, A. (1975) Biochem. Biophys. Acta
385, 242 - 256
- SKUSTER, J.R. und GRAVES, D.J. (1977) 11th Febs Metting,
Copenhagen 1977, Abstract A₁-6, O603/4
- SPERLING, J.E. (1978) Dissertation, Ruhr Universität Bochum
- STULL, J.T., BROSTROM, C.O. und KREBS, E.G. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 5272 - 5274
- SZENT-GYÖRGYI, A.D., MAZIA, D. und SZENT-GYÖRGYI, A. (1955)
Biochem. Biosphys. Acta 16, 339 - 342
- VAN EERD, P.J. und TAKAHASHI, K. (1975) Biochem. Biophys.
Res. Commun 64, 122 - 127

- VARSÁNYI, M. und HEILMEYER, L.M.G., Jr. (1979) Febs Lett.
in Press
- WALSH, D.A., PERKINS, J.B., BROSTROM, C.O. und KREBS,
E.G. (1971) J. Biol. Chem. 246, 1968 - 1976
- WANG, J.H., STULL, J.T., HUANG, T.S. und KREBS, E.G.
(1976) J. Biol. Chem. 251, 4521 - 5427
- WEBER, K., OSBORNE, M. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4406 - 4412
- WILKINSON, J.M., PERRY, S.V., COLE, H.A. und TRAYER, J.P.
(1972) Biochem. J. 127, 215 - 224
- WILKINSON, J.M. und GRAND, R.J.A. (1975) Biochem. J. 149,
493 - 496
- YEAMAN, S.J. und COHEN, P. (1975) Eur. J. Biochem. 51,
93 - 104
- ZIEVE, F.J. und GLINSMANN, W.H. (1973) Biochem. Biophys.
Res. Commun. 50, 872 - 878

LEBENS LAUF

- 13.7.1946 geboren als Sohn des Kaufmanns Ali Djovkar
und seiner Ehefrau Fatemeh in Zaraghan
- 1952 - 1958 Besuch der Volksschule in Zaraghan und Schiraz
- 1959 - 1964 Besuch des naturwissenschaftlichen Zweiges
des Schapur-Gymnasiums in Schiraz
- Okt. 1964 Abitur
- 1965 - 1966 Deutschkurs für Ausländer bei der Universität
München
- 1966 - 1967 Studienkolleg bei der Universität Würzburg
- Okt. 1967 Aufnahme des Studiums der Biologie an der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- Okt. 1973 Diplom-Hauptexamen
- Nov. 1974 Abschluß meiner Diplomarbeit am Physiologisch-
chemischen Institut der Universität Würzburg
- Jan. 1975 - Beginn der vorliegenden Doktorarbeit am Institut
für Physiologische Chemie der Ruhr Universität
Bochum
- Dez. 1978

Offsetdruck
GmbH & Co. KG.

88 Bamberg Hohe-Kreuz-Str 9b

M. SCHADEL

• Tel. 0951/54414 • 58481 •